

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Allgemein- und Transplantationschirurgie

**Einfluss des hydrophilen Gallensalzes Tauroursodesoxycholat
auf die Zusammensetzung von Gallenflüssigkeit:
Studie in einem in-vivo Transplantationsmodell beim Schwein**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Jan Markus Lutz
aus Hamburg
2004

Dekan: Univ.- Prof. Dr. rer. nat. K.- H. Jöckel
1.Gutachter: Univ.- Prof. Dr. med. Ch. E. Broelsch
2.Gutachter: Univ.- Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. H. de Groot

Tag der mündlichen Prüfung: 16. November 2005

meinem Vater

Inhalt

1.Einführung

1.1.	Lebertransplantation	6
1.1.1.	Geschichte der Lebertransplantation	6
1.1.2.	Indikationen und Kontraindikationen der Lebertransplantation	8
1.1.3.	Komplikationen nach Lebertransplantation	10
1.2.	Präservations- und Reperfusionsschäden des Gallentraktes	15
1.2.1.	Überblick	15
1.2.2.	Ursachen der Präservations- und Reperfusionsschäden	16
1.2.3.	Methoden zur Vermeidung von Präservations- und Reperfusionsschäden	17
1.3.	Gallensäuren	20
1.3.1.	Aufbau und Eigenschaften von Gallensäuren	20
1.3.2.	Tauroursodesoxychololat (TUDC)	22
1.3.3.	Einsatz von TUDC in der Lebertransplantation	23
1.4.	Fragestellung	26
1.5.	Wahl des Untersuchungsverfahrens	28

2.Material und Methoden

2.1.	Versuchskonzeption	29
2.2.	Probengewinnung	30
2.2.1.	Versuchstiere	30
2.2.2.	Präoperative Maßnahmen	30
2.2.3.	Narkoseeinleitung	30
2.2.4.	Hepatektomie beim Spender	30
2.2.5.	Implantation beim Empfänger	31
2.2.6.	Postoperative Maßnahmen	33
2.2.7.	TUDC/NaCl-Infusionen	33

2.2.8. Probenentnahme	33
2.2.9. Immunsuppression	34
2.3. Laborbearbeitung	35
2.3.1. Verwendetes Gerät	35
2.3.2. Herstellung von Gallensäure-Standardlösungen	35
2.3.3. Standardmessungen	36
2.3.4. Probenmessung	36
2.3.5. Ergebnisbearbeitung	36
2.4. Statistische Analyse	37
3. Ergebnisse	
3.1. Operationsergebnisse	38
3.2. Laborergebnisse	39
3.2.1. Vorbemerkung	39
3.2.2. Tauroursodesoxycholol (TUDC)	40
3.2.3. Taurocholol (TC)	42
3.2.4. Glycocholol (GC)	44
3.2.5. Taurochenodesoxycholol (TCDC)	46
3.2.6. Taurodesoxycholol (TDC)	48
3.2.7. Glycochenodesoxycholol (GCDC)	50
3.2.8. Ergebnisübersicht	52
4. Diskussion	53
5. Zusammenfassung	63
6. Literaturverzeichnis	64
7. Abkürzungsverzeichnis	71
8. Danksagung	75
9. Lebenslauf	76

1. Einführung

1.1. Lebertransplantation

1.1.1. Geschichte der Lebertransplantation

Im Vergleich zu zahlreichen anderen Verfahren der Abdominalchirurgie handelt es sich bei der Lebertransplantation um eine noch sehr junge Technik.

Die ersten Experimente in diesem Feld wurden in den fünfziger Jahren von Welch (Welch 1955) und Cannon (Cannon 1956) an Hunden durchgeführt, die ersten erfolgreichen orthotopen Lebertransplantationen – ebenfalls an Hunden – gelangen wenige Jahre später Moore (Moore et al. 1959) und Starzl (Starzl et al. 1960).

Neben operationstechnischen Schwierigkeiten erwies sich damals vor allem die Abstoßung transplanterter Gewebe und Organe als großes Hindernis (Starzl, Demetris 1990). Die zu diesem Zeitpunkt noch übliche Gabe einer einzelnen immunsuppressiven Substanz (Kortikosteroide, Azathioprin) oder auch der Ganzkörperbestrahlung erwies sich bestenfalls als ineffektiv, teilweise sogar als gefährlich (Starzl 1996).

Ein Durchbruch gelang hier 1962 – 1963, als anhand von Tierversuchen die synergetischen Effekte einer Azathioprin / Prednison – Kombination erkannt wurden. (Marchioro et al. 1964)

In den Jahren 1963 – 1967 gelangen Starzl die ersten sieben orthotopen Lebertransplantationen am Menschen. Keiner der Operierten lebte postoperativ jedoch länger als 23 Tage. Neben weiterhin bestehenden Problemen mit der Immunantwort der Patienten waren dafür eine Reihe verschiedener Faktoren verantwortlich, u.a. schlechter körperlicher Zustand der schwerkranken Patienten, unkontrollierbare Infektionen und auch die noch ungenügenden operations-technischen Kenntnisse. (Schaffner 1992)

Wissen und handwerkliche Fähigkeiten nahmen in den Folgejahren jedoch immer weiter zu, so dass von den 170 zwischen 1968 und 1979 operierten Patienten bereits 30 (18%) länger als 10 Jahre überlebten. (Keeffe 2001)

Um aus dem Stadium einer experimentellen Technik hervorzutreten, waren diese Ergebnisse für die Lebertransplantation allerdings noch nicht ausreichend.

Dies änderte sich mit der Einführung von Cyclosporin zur Immunsuppression 1980. Mit diesem neuartigen Medikament waren nunmehr Ein-Jahres-Überlebensraten von über 70% (Starzl, Klintmalm et al. 1981) möglich – ein ausschlaggebender Faktor, als bei der National Institutes of Health Consensus Development Conference 1983 festgestellt wurde, dass die Lebertransplantation nicht länger als experimentell zu betrachten sei. (Keeffe 2001)

Allein die Anzahl der Lebertransplantationszentren in den USA schnellte daraufhin von 1 (1982) auf 109 (1993) in die Höhe. (Morrissey, Rustand 1996)

Tab.1 Ausgewählte historische Ereignisse in der Geschichte der Lebertransplantation (nach Keefe 2001)

Jahr	Ereignis
1955	Erste experimentelle Lebertransplantation mit einer Zweitleber (Welch)
1956	Erste experimentelle orthotope Lebertransplantation (Cannon)
1963	Verwendung von Azathioprin und Prednison zur Immunsuppression
1963	Erste Lebertransplantation am Menschen (Starzl)
1966	Einführung von Antilymphozytenglobulin
1967	Erstes Einjahresüberleben nach einer Lebertransplantation am Menschen (Starzl)
1980	Einführung von Cyclosporin zur Immunsuppression
1983	National Institutes of Health "Consensus Development Conference on Liver Transplantation"
1987	Verwendung von University of Wisconsin- (UW-) Lösung zur verbesserten Organpräservierung
1989	Einführung von Tacrolimus zur Immunsuppression

Heute präsentiert sich die orthotope Lebertransplantation als ein, wenngleich auf hochspezialisierte Zentren angewiesenes, so doch weltweit akzeptiertes und praktiziertes Verfahren zur Behandlung chronischer, anders nicht beherrschbarer Leberkrankheiten.

Im Rahmen der steigenden Erfahrung konnten die chirurgischen Techniken, das Verständnis für die der Abstoßung zugrunde liegenden Immunreaktionen, die immunsuppressive Therapie, Verfahren zur Organpräservierung, die Verhinderung und Bekämpfung von Infektionen, die Zahl zur Verfügung stehender Spenderorgane sowie die Auswahl geeigneter Empfänger beständig weiter verbessert werden. (Schaffner 1992)

In Europa wurden zwischen 1988 und 1996 22036 Lebertransplantationen durchgeführt. Das Einjahrespatientenüberleben betrug dabei 76%. (Margreiter 1998)

Die weitere Entwicklung der Lebertransplantation wird von einander entgegenstehenden Faktoren bestimmt werden: einerseits von den Chancen eines weiter voranschreitenden medizinisch-technischen Fortschritts, andererseits von wachsenden Problemen, die v.a. aus einem derzeit kaum zu lösenden Spendermangel und größer werdenden ökonomischen Zwängen resultieren.

Neue Ansätze in der Lebertransplantation sind u.a. die Split-Liver-Transplantation, die Transplantation vom lebenden Spender, die Xenotransplantation und die Hepatozytentransplantation. (Keeffe 2001) Gentechnologische Verfahren versprechen Erfolge v.a. im Bereich der Behandlung von Lebererkrankungen, aber auch in einer verbesserten perioperativen Steuerung des Immunsystems. (Shaked, Drazan 1996)

Demgegenüber steht – auch wenn viele der neuen Entwicklungen hier möglicherweise Erleichterung bringen werden – ein massiver Organmangel. Nur zwischen 10 (Italien) und 25 (Spanien) von einer Million Einwohner stehen in der westlichen Welt als Organspender zur Verfügung. So stehen in den USA rund 4500 jährlichen Transplantationen (1999) mehr als 16000 Patienten auf der Warteliste (2000) gegenüber, von denen zahlreiche während ihrer Wartezeit versterben. (Keeffe 2001)

Und auch die Frage, wie die nationalen Gesundheitssysteme ein weiteres Anwachsen der Transplantationszahlen finanzieren können, ist bislang nicht zufriedenstellend gelöst.

Die Lebertransplantation war zu Beginn der 1990er Jahre die teuerste vom staatlichen Gesundheitswesen der USA (Medicare) finanzierte chirurgische Maßnahme. Ihre Kosten lagen bereits damals bei fast US\$ 300000 pro Eingriff. (Morrissey, Rustand 1996) Es ist leicht einsehbar, dass insbesondere komplizierte postoperative Verläufe schnell astronomisch hohe Kosten verursachen können.

1.1.2. Indikationen und Kontraindikationen der Lebertransplantation

Die Indikationen zur Lebertransplantation nehmen ständig zu. Während in früheren Jahren das hohe mit diesem Eingriff verbundene Risiko nur unmittelbar lebensrettende Transplantationen bei schwerstkranken Patienten (v.a. Malignome) indiziert sein ließ, ist sie heute ein für ein breites Spektrum von akuten und chronischen Leberleiden eingesetztes Verfahren.

Grundsätzlich sollte die Lebertransplantation bei Patienten mit Lebererkrankungen erwogen werden, bei denen sie die Lebenserwartung erhöhen, oder zumindest eine Verbesserung der Lebensqualität des Patienten erreichen würde.

In der Praxis wird die Indikation üblicherweise angenommen, wenn Patienten weniger als ein Jahr Überlebenserwartung oder aber eine kaum erträgliche Lebensqualität aufgrund einer Lebererkrankung besitzen. (Rockey 2001)

Zwischen 1988 und 1996 lagen in Europa zu 58% Zirrhosen, 12% cholestatische Erkrankungen, 11% akute Leberversagen, nur noch 10% Malignome und 5% metabolische Erkrankungen den durchgeführten Lebertransplantationen zugrunde. (Margreiter 1998)

Tab. 2 ausgewählte Indikationen zur Lebertransplantation (gekürzt nach Margreiter 1998)

Fortgeschrittene chronische Lebererkrankungen	<ul style="list-style-type: none"> - Vorwiegend cholestatische Lebererkrankungen, z.B. PBC, PSC, Gallengangsatresie - Vorwiegend hepatozelluläre Störungen, z.B. viral induzierte, alkoholtoxische, autoimmune Lebererkrankungen - Vorwiegend vaskuläre Erkrankungen, z.B. Budd-Chiari-Syndrom - Polyzystische Lebererkrankungen
Nicht resezierbare Lebertumore	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatozelluläres Karzinom - Cholangiozelluläres Karzinom - Metastasen endokriner Tumore
Stoffwechselstörungen	<ul style="list-style-type: none"> - α1-Antitrypsinmangel - Hämochromatose - Morbus Wilson - Glykogenspeicherkrankheiten Typ I und IV
Fulminantes Leberversagen	<ul style="list-style-type: none"> - Virushepatitis A,B,C,D,E, EBV - Medikamenteninduziertes Leberversagen - Stoffwechselstörungen, z.B. Morbus Wilson, Reye-Syndrom

Ähnlich den Indikationen sind auch die Kontraindikationen der Lebertransplantation im Rahmen neuer Erkenntnisse und Fähigkeiten veränderlich.

Zustände, die früher als absolute Kontraindikation galten, werden mittlerweile nur noch als relative Kontraindikation betrachtet, z.B. die Pfortaderthrombose.

Demgegenüber ist z.B. die chronische Hepatitis B – aufgrund der hohen Rate an Wiedererkrankungen – mittlerweile nicht mehr als Indikation, sondern vielmehr als relative, bisweilen auch absolute, Kontraindikation eingestuft.

Eine allgemeingültige Zusammenstellung der Kontraindikationen ist vor diesem Hintergrund nicht möglich, zumal jedes Transplantationszentrum eigene Kriterienkataloge aufstellt.

Generell sind solche Umstände als absolute Kontraindikation anzusehen, die ein so schlechtes Transplantationsergebnis im Hinblick auf Lebenserwartung oder –qualität erwarten lassen, dass die Transplantation als therapeutische Option nicht mehr erwogen werden kann.

Hierunter fallen v.a. schwere kardiopulmonale Erkrankungen und extrahepatische Malignome.

Tab.3 ausgewählte Kontraindikationen zur Lebertransplantation (nach Margreiter 1998)

Absolute Kontraindikationen	<ul style="list-style-type: none"> - Sepsis (ausgenommen Gallenwege) - Lebertumore mit extrahepatischer Manifestation - Fortgeschrittene kardiopulmonale Erkrankungen - AIDS
Relative Kontraindikationen	<ul style="list-style-type: none"> - Fortgeschrittenes chronisches Nierenversagen - Alter > 60 Jahre - Pfortaderthrombose - Hypoxie bei intrapulmonalen Shunts - HBV-DNA-Positivität - Portosystemische Shuntoperation - Alkoholismus - Drogenabhängigkeit - HIV-Positivität - Fortgeschrittene Unterernährung

1.1.3. Komplikationen nach Lebertransplantationen

Zur Betrachtung der Komplikationen nach einer Lebertransplantation bietet sich die Unterscheidung zwischen „frühen“ und „späten“ Komplikationen an.

Als „frühe“ Komplikationen werden die Komplikationen bezeichnet, die im unmittelbaren postoperativen Verlauf, also noch während des stationären Aufenthaltes des Patienten und in den dann folgenden Wochen auftreten.

„Späte“ Komplikationen sind solche, die im weiteren Verlauf, also nach mindestens drei bis sechs Monaten auftreten.

Mazariegos et al. beschreiben folgende frühe Komplikationen: (Mazariegos et al. 1999)

a) Extrahepatische Komplikationen

Hierzu zählen v.a. pulmonale, renale und neurologische Probleme.

Häufige pulmonale Störungen sind postoperative Atelektasen und Pleuraergüsse. In selteneren Fällen kommt es zur Ausbildung von Lungenödem, ARDS, pulmonalem Hypertonus und dem hepatopulmonalen Syndrom.

Renale Funktionsstörungen sind ausgesprochen häufig (Inzidenz >90%), jedoch zumeist nur von kurzer Dauer. Zumeist treten sie als hypovolämiebedingte Oligurie auf. Eine schwerwiegendere Komplikation stellt das hepatorenale Syndrom dar.

Neurologische Störungen treten zumeist in Form medikamentös-toxischer ZNS-Nebenwirkungen auf (Dysphorie, Verwirrung, Koma). Auch Krampfanfälle, Hirnblutungen und –infektionen treten postoperativ auf.

b) Infektkomplikationen

55% der postoperativen Infektionen sind bakteriell bedingt, die übrigen zu gleichen Teilen viral und fungal.

Von den bakteriellen Infektionen tritt die Mehrzahl innerhalb der ersten zwei Wochen nach der Operation auf. Neben pulmonalen Infekten sind typischerweise Leber und Gallensystem, Blut, Peritoneum und Wundareale betroffen.

Pilzinfektionen treten v.a. innerhalb der ersten acht postoperativen Wochen auf und sind zumeist durch die hohen Steroid- und Antibiotikagaben zu erklären, die zahlreiche Patienten benötigen.

Bei viralen Infekten kommt es v.a. zu Reaktivierungen von Herpes-simplex-Infektionen, aber auch zu schwerwiegenden Neuinfektionen mit dem Cytomegalievirus (CMV) und dem Epstein-Barr-Virus (EBV). Folgen einer CMV-Infektion können Hepatiden, Gastritiden und Pneumonien sein, bei EBV-Infektion kann es zum Bild der Mononucleose kommen. Darüberhinaus kann EBV v.a. bei Kindern die maligne PTLN (post-transplant lymphoproliferative disease) verursachen, die selbst mit Chemotherapie nur schwer therapierbar ist.

c) Allograft-Komplikationen

Innerhalb der ersten zwei Wochen nach Transplantation kann es zu einer akuten Abstoßungsreaktion kommen, die durch erhöhte Leberenzymwerte gekennzeichnet ist und zu einer Gallengangs- und Leberendothelentzündung führen kann. Eine entschlossene Steroidgabe vermag diese Reaktion zumeist zu stoppen.

Schwerer zu beherrschen ist ein primäres Spenderorganversagen (innerhalb der ersten drei Monate), das mit erheblichen Folgekomplikationen verbunden ist (Gerinnungsstörungen, hepatische Enzephalopathie, fortschreitendes Multiorganversagen). Bei diesem Krankheitsbild ist oftmals eine Retransplantation erforderlich.

d) Chirurgische Komplikationen

Aufgrund fortschreitender chirurgischer Erfahrung mit der Lebertransplantation werden diese Komplikationen immer seltener. Dennoch kann es vereinzelt zu Stenosen und Thrombosen der A.hepatica (HAS, HAT) kommen, darüber hinaus zu Stenosen, Thrombosen und Obstruktionen der V.portea und der V.cava inf. Einmal erkannt, sind diese Komplikationen zumeist durch Revaskularisationen gut in den Griff zu bekommen.

e) Gastrointestinale Komplikationen

7% - 15% der postoperativen Patienten bluten v.a. innerhalb der ersten drei Monate intraabdominell oder gastrointestinal. Ursachen sind zumeist Ulcera, Enteritiden oder Läsionen durch Pfortaderhochdruck. Auch diese Komplikationen sind zumeist gut beherrschbar.

In Einzelfällen, v.a. bei schwierigen anatomischen Verhältnissen (Kinder), besteht die Gefahr einer Darmperforation.

f) Komplikationen der Gallenwege

Diese Komplikationen nehmen eine besonders wichtige Stellung ein. Ihre Inzidenz ist mit 8% - 15% beschrieben, ihre Mortalitätsrate mit 10%.

Ein Hauptproblem bei der Behandlung von Gallengangskomplikationen liegt in ihrer schwierigen Erkennung. Die relevanten Laborwerte (γ GT, Bilirubin, AP) weisen differentialdiagnostisch ebenfalls in Richtung Sepsis, ischämische Organschädigung oder Abstoßung. Greif et al. beschrieben, wie von 83 im Rahmen einer Studie überprüften Patienten mit Gallentrakt-Komplikation fast die Hälfte zunächst auf eine vermutete akute Abstoßung hin therapiert wurde. (Greif et al. 1994)

Frühe Komplikationen in diesem Bereich sind zumeist anastomotische Lecks der Choledochocholedochostomie oder Choledochojejunostomie (zumeist im ersten Monat nach der Operation), oder (zumeist zwischen dem ersten und dritten Monat auftretend) Gallengangsobstruktionen, die ebenfalls anastomotischer Natur sein können, jedoch auch als Folge von A.hepatica Thrombosen und Stenosen auftreten.

Nichtanastomotische Gallengangsstrikturen entwickeln sich zumeist im weiteren Verlauf. Auf sie wird im Folgenden gesondert eingegangen.

Die späten Komplikationen nach Lebertransplantation untergliedert und beschreibt Tan wie folgt: (Tan 2000)

a) Medikationsbedingte Komplikationen

Aufgrund der dauerhaft erforderlichen Immunsuppression mit Cyclosporin oder Tacrolimus, sowie zumeist lang anhaltenden Steroidgaben, kommt es zu typischen unerwünschten Wirkungen dieser Medikamente: Hypertonus, Niereninsuffizienz, Diabetes Mellitus, Hyperlipidämie.

Die Komplikationen lassen sich zumeist gut symptomatisch behandeln.

b) Host-Komplikationen

2% - 17% aller Leberempfänger durchlaufen eine chronische Abstoßung des Spenderorgans. Besonders bedroht sind Patienten, die bereits Episoden akuter Abstoßung durchlaufen haben.

Bei zunehmend schlechter werdender Leberfunktion ist (wie bei der akuten Abstoßung) eine verstärkte Immunsuppression erforderlich. Sollte dies keinen Erfolg haben, muss eine Retransplantation erwogen werden.

Die bereits erwähnte PTLD (post-transplant lymphoproliferative disease), ein mit akuter EBV-Infektion bei Immunsuppression assoziiertes B-Zell-Lymphom, das v.a. bei Kindern auftritt, ist eine weitere, sehr schwerwiegende Komplikation. Die Therapie (Absetzen der Immunsuppression, ggf. Chemotherapie) bleibt leider oft erfolglos.

Ebenfalls v.a. bei Kindern auftretend ist die Posttransplantations-Autoimmunhepatitis, die zusammen mit antinukleären Antikörpern und erhöhten IgG-Werten auftritt. Diese Komplikation tritt median 24 Monate nach der Operation auf. Sie wird analog der klassischen Autoimmunhepatitis v.a. mit Steroiden und Azathioprin behandelt.

Schließlich zählen auch wiederkehrende maligne Erkrankungen zu den Host-Komplikationen. Ihre Behandlung und Überlebensraten sind sehr stark vom Erkrankungstyp abhängig.

c) Graft-Komplikationen

Zwei Komplexe machen die wesentlichen Graft-Komplikationen aus.

Zum einen Graft-Schäden durch Wiederauftreten der vor der Transplantation bestehenden Empfängergrundkrankheit, z.B. PBC, Hepatitis B oder C.

Die PBC tritt dabei üblicherweise nur subklinisch auf, so dass nur selten eine Retransplantation erforderlich wird.

Problematischer ist die Situation bei den Virushepatitiden: die Wiederkehr einer Hepatitis C ist z.Z. praktisch nicht vermeidbar. Die Therapie muß daher darauf abzielen, eine möglichst langsame Progredienz durch zurückhaltende Immunsuppression und antivirale Begleitmedikation zu erreichen.

Bei der Hepatitis B wird versucht, durch Beachtung des viralen Replikationsstatus nur nicht-replikative Patienten zu transplantieren.

Den zweiten wesentlichen Komplex bei den späten Graft-Komplikationen stellen die Gallengangsstrikturen dar, die bei bis zu 19% der Leberempfänger innerhalb der ersten vier Monate beschrieben werden. Klinisch zeigen sich v.a. Leberfunktionsstörungen und Cholangitiden. Als Ursachen kommen u.a. lange Organischämiezeiten, Graft-AB0-Inkompatibilität und A.hepatica-Ischämie infrage. Falls eine Behandlung mit Dilatation oder Stent nicht erfolgreich ist, muss oftmals erneut transplantiert werden.

Frühe und späte Komplikationen der orthotopen Lebertransplantation sind zwar oftmals erfolgversprechend behandelbar, dennoch stellen sie eine große Gefahr für das Spenderorgan, Lebensqualität und Überleben des Patienten dar. Die Behandlung einer Komplikation muss oftmals gegen die Risiken anderer Komplikationen abgewogen werden, insbesondere im Bereich der Immunsuppression.

Besonders tückische Komplikationen finden sich im Bereich des Gallensystems. Sie können sowohl früh, als auch spät eintreten und ihre anfänglichen Symptome sind überaus unspezifisch. Gleichwohl sind sie sehr bedrohlich im Hinblick auf die Mortalität der Patienten und die Erforderlichkeit von Retransplantationen.

1.2. Präservations- und Reperfusionsschäden des Gallentraktes

1.2.1. Überblick

Wie bereits erwähnt, kann es im Bereich des Gallentraktes sowohl zu anastomotisch, als auch zu nicht-anastomotisch bedingten Schäden kommen, zumeist in Form von Strikturen der Gallengänge.

Mit zunehmender Perfektionierung der chirurgischen Techniken traten die anastomotischen Komplikationen in den Hintergrund, während die nicht-anastomotischen Schäden des Gallentraktes vermehrt Forschungsgegenstand geworden sind.

Schon früh hat sich gezeigt, dass eine signifikante Korrelation zwischen der Ischämiezeit des Transplantats und der Häufigkeit nicht-anastomotischer Gallengangsschäden besteht. So zeigten Sanchez-Urdazpal et al. in einer Studie, dass 35% aller mit UW-Lösung präservierten Transplantate mit einer Ischämiezeit von mehr als 11,5 Stunden ITBC (ischaemic-type biliary complications) aufwiesen, demgegenüber jedoch nur 2% der kürzer als 11,5 Stunden ischämischen Transplantate. (Sanchez-Urdazpal et al. 1992)

In morphologischen Studien konnte gezeigt werden, dass Leberendothelzellen sowohl in der kalten Ischämiephase, als auch in der Reperusionsphase geschädigt werden. Demnach büßen die Endothelzellen mit zunehmender Ischämiezeit ihre Funktion ein, und sterben während der nur kurzen Reperfusionphase ab. (Kukan, Haddad 2001)

Aufgrund des Zusammenwirkens der zwei Phasen, und da für die Schäden während der kalten Ischämiezeit neben ischämischen auch andere (z.B. toxische, immunologische) Vorgänge verantwortlich gemacht werden, spricht man mittlerweile von Präservations-/Reperfusionsschäden des Gallentraktes.

Diese Schäden sind von immenser Bedeutung. Sie resultieren in signifikant verlängerten Krankenhausaufenthalten der Organempfänger (Sanchez-Urdazpal et al. 1993) zur Behandlung der mit ihnen verbundenen Komplikationen und werden verantwortlich gemacht für rund 10% aller erforderlich gewordenen Retransplantationen durch frühen Graft-Verlust. (Kurokawa, Takagi 1999) Während sich das Ein-Jahres-Überleben der transplantierten Patienten nicht signifikant ändert (Sanchez-Urdazpal et al. 1993), verursachen Präservations-/Reperfusionsschäden durch die vermehrte Retransplantationsrate eine weitere Verknappung des Spendeorganangebots und sind nicht zuletzt verantwortlich für eine wesentliche Kostensteigerung.

1.2.2. Ursachen der Präservations- und Reperfusionsschäden

Sanchez-Urdazpal et al. haben gezeigt, dass die Dauer der Ischämiezeit einer Transplantat-Leber großen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Gallengangskomplikationen hat. Sie stellen dar, dass Ischämie-Lagerung des Organs das Gallengangsgewebe in zweifacher Hinsicht schädigen kann – zum einen durch direkte ischämische Schädigung der Zellen, zum anderen durch Prädisposition zu Reperfusionsschädigungen. (Sanchez-Urdazpal et al. 1992)

Diese Prädisposition entsteht v.a. durch den Mangel der Zellen an Energielieferanten („ATP-Depletion“) und nachfolgender Funktionseinbuße membrangebundener Ionenpumpen.

In der Reperusionsphase kommt es dann durch ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Vorgänge zu einer Zellschädigung: die Schwellung endothelialer Zellen, Vasokonstriktion, Leukozyten-Einwanderung und Thrombozytenaggregation in den Lebersinusoiden führen zu einer Störung der Mikrozirkulation und zu Schäden an der Gallengangsbasalmembran. (Kukkan, Haddad 2001; Serracino-Inglott et al. 2001)

Die ohnehin schädigende Zellschämie wird so weiter verlängert, es kommt zu Zell-Desquamation und Zelltod, als Spätfolge dieser Vorgänge oft zu Gallengangsstrikturen. Darüberhinaus hat sich seit längerem der schädigende Einfluß von Gallenflüssigkeit auf das Leber- und Gallengangsgewebe herausgestellt. Knoop et al. zeigten bereits 1992, dass in Galle – oder einer 1:1 Mischung von Galle und UW-Lösung – gelagertes Gallengangsgewebe bereits nach relativ kurzer Lagerungsdauer (12-24 Stunden) nekrotisch wurde, während das in reiner UW-Lösung gelagerte Gallengangsmaterial auch nach 72 Stunden noch teilweise gut erhalten war. (Knoop et al. 1992)

Für den schädigenden Einfluß der Gallenflüssigkeit auf das Gallengangsgewebe werden hydrophobe Gallensäuren verantwortlich gemacht, während hydrophilen Gallensäuren ein gallengangsprotektiver Einfluß – auf den in dieser Arbeit später eingegangen werden wird - nachgewiesen werden konnte. Hertl et al. wiesen diesen Effekt nach, indem sie entnommenes Gallengangsgewebe vom Schwein für 20 Stunden dem hydrophoben Taurodesoxycholat aussetzten, was zu einer Beschleunigung destruktiver Vorgänge führte, während Lagerung im hydrophilen Tauroursodesoxycholat eine Verzögerung der Präservationschäden herbeiführte. (Hertl et al. 1995)

Benedetti et al. haben zahlreiche Gallenflüssigkeiten auf ihre Cytotoxizität untersucht und dabei ebenfalls festgestellt, dass unkonjugierte, hydrophobe Gallensäuren starke

Schäden im Gallenepithel hervorrufen, während hydrophilere Gallensäuren keine schädigenden Einflüsse zeigten. (Benedetti et al. 1997)

Für den schädigenden Einfluss der hydrophoben Gallensäuren werden ihre lösenden Eigenschaften verantwortlich gemacht. Während vitales, gesundes Gallengangsgewebe sich fortlaufend regenerieren und gegen solche Einflüsse schützen kann, ist das Gallengangsgewebe unter Präservationsbedingungen anfälliger für Schäden durch Löse-Vorgänge an der Zellmembran.

In einer weiteren Studie untersuchten Hertl et al. mithilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen die Schäden an Schweine-Gallengangsgewebe unter Präservationsbedingungen. Gewebe, das hydrophoben Gallensäuren ausgesetzt war, zeigte dabei einen deutlich beschleunigten Schädigungsprozess, mit Erosionen der Zelloberfläche und einem Verlust der Micovilli, was nach bereits 8 Stunden zu einer vollständigen Zerstörung des Zellgewebes führte. (Hertl et al. 2000)

Ursachen und pathophysiologische Abläufe der Präservations- und Reperfusionsschäden waren noch vor wenigen Jahren völlig unklar, und sind gegenwärtig Gegenstand intensiver Forschung.

1.2.3. Methoden zur Vermeidung von Präservations- und Reperfusionsschäden

Moderne Transplantationsmedizin ist angewiesen auf den Austausch von Organen über große Distanzen und auf eine angemessene Vorlaufzeit der Operationen, da nur so ein sicherer Verlauf der Transplantation gewährleistet werden kann.

Auch im Verlauf der Operation ist es unvermeidlich, das Transplantat für eine gewisse Zeit außerhalb der Spender- und Empfängerkörper zu lagern.

Es ist daher von zentraler Bedeutung, über Methoden zu verfügen, die eine möglichst lange Lagerungszeit des Organs bei möglichst geringen daraus resultierenden Schäden ermöglichen.

Wie bei nahezu allen transplantierbaren Organen hat sich bei der Lebertransplantation die Kaltlagerung als bislang beste Lagerungsmethode erwiesen. Bei ihr wird das Transplantat während der Organentnahme aortal, sowie i.d.R. auch durch die Vena portae, mit einer eiskalten Lagerungslösung gespült, bevor es bis zur Wiedereinpflanzung in Eiswasser gelagert wird. Auf diese Weise wird eine Organtemperatur nahe 0°C erreicht. (Lemasters et al. 2001)

Durch diese Hypothermie wird eine signifikante Verlangsamung – bei einer Temperatursenkung von 37°C auf 0°C verringert sich die Stoffwechselrate auf ein

Zehntel (Fuller 1991) - organschädigender Prozesse erreicht, wodurch sich die Ischämietoleranz des Organs erheblich erhöht. (Für Nieren beschrieben Calne et al. bereits vor rund 40 Jahren eine Toleranz von rund 12 Stunden, gegenüber erheblichen Schäden bereits nach einer Stunde ohne Eiskühlung. (Calne et al. 1963))

Trotz dieser erheblichen Verbesserung der Organpräservierung finden jedoch auch im eisgekühlten Transplantat weiterhin schädigende Prozesse statt.

Um dem entgegenzuwirken, wird versucht, dem Zellgewebe des Organs möglichst optimale physikalische und biochemische Bedingungen zu bieten, wofür spezielle Spül- und Lagerungslösungen entwickelt wurden.

Ein großer Schritt auf diesem Weg war die Entwicklung der Euro-Collins- Lösung, deren hoher Kalium- und niedriger Natrium- und Calciumgehalt dem Verlust der Elektrolytgradienten an der Zellmembran während der Ischämiezeit entgegenwirken, und deren hoher Glucoseanteil die Energiegewinnung der Zelle durch anaerobe Glykolyse unterstützt. (Lemasters et al. 2001)

Die Euro-Collins-Lösung erwies sich als deutlich überlegen gegenüber früheren Lagerungslösungen, z.B. Plasma oder physiologischen Salzlösungen, und ermöglichte Präservationszeiten von bis zu acht Stunden. (Benichou et al. 1977)

Noch deutlich übertroffen wurde dies durch die Entwicklung der UW (University of Wisconsin) -Lösung in den späten 1980er Jahren. Sie ist trotz ständiger Versuche, noch weiter verbesserte Produkte zu entwickeln, bis heute die Standard-Lagerungslösung bei Lebertransplantationen.

Die UW-Lösung war gegenüber der Euro-Collins-Lösung noch um zahlreiche Inhaltsstoffe ergänzt worden, insbesondere Hydroxyethylstärke zur Verminderung interstitieller Ödeme, Adenosin, um den Zellen bei Wiederaansteigen der Stoffwechselaktivität eine schnelle Regeneration von ATP zu ermöglichen, sowie Insulin zur Glykolysestimulation.

Eine Übersicht über die wichtigsten Komponenten der UW-Lösung ist in Tabelle 4 gegeben.

Tab.4 Wichtige Komponenten der UW-Lösung und ihnen zugeschriebene Funktionen (nach Southard, Belzer 1996)

Komponente	Zugeschriebene Funktion
Lactobionat	- Verminderung der Permeabilität (reduziert Zellschwellung) - Calcium-Bindung (reduziert Calcium im Zytosol) - Eisen-Bindung (reduziert Eisen im Zytosol)
Raffinose	Verminderung der Permeabilität, Saccharid (reduziert Zellschwellung)
Hydroxyethylstärke	Kolloid (reduziert Zellschwellung)
Adenosin	Vorstufe in der Adenin-Nukleotid-Synthese
Glutathion	Fänger freier Radikale
Allopurinol	Xanthin-Oxidase-Generationshemmer
Magnesium	Enzymkofaktor
Natrium und Kalium	Osmotische Agensien
Dexamethason	Membranstabilisation
Phosphat	Wasserstoff-Ionen-Puffer und Vorstufe in der ATP-Synthese

Hypothermie und Lagerungslösungen können das Auftreten von Präservations- und Reperfusionsschäden verzögern und ihr Ausmaß verringern, jedoch nicht vermeiden.

Dies liegt unter anderem daran, dass die bislang existierenden Spül- und Lagerungslösungen mit ihrer Zusammensetzung nicht allen relevanten schädigenden Faktoren entgegenwirken können.

Darüberhinaus wird angenommen, dass beim Spülvorgang nur die größeren Gefäßbereiche der Leber suffizient mit UW-Lösung gespült werden, die kleineren, proximalen Anteile der Blutgefäße und vor allem der Gallenwege aber offenbar nicht ausreichend auf die Ischämiephase vorbereitet werden.

Forschungsgegenstand müssen neben der Entwicklung weiter optimierter Spülflüssigkeiten daher auch Techniken sein, mit deren Hilfe entlegenste Gefäßbereiche besser gegen schädigende Einflüsse geschützt werden können.

1.3. Gallensäuren

1.3.1. Aufbau und Eigenschaften von Gallensäuren

Gallensäuren werden von den Leberzellen synthetisiert und mit der Gallenflüssigkeit über die Gallenwege zum Duodenum geführt, wo sie dem Speisebrei zugeführt werden. Sie dienen der Emulgation der im Speisebrei vorhandenen Fette, die damit verdaubar gemacht werden.

Gallensäuren unterliegen einer starken Rückresorption. 95% der über die Gallenflüssigkeit ausgeschiedenen Gallensäuren entstammen der entero-hepatischen Zirkulation, nur rund 5% werden neu synthetisiert. (Hertl 1999)

In der Leber werden zwei neu synthetisierte – primäre – Gallensäuren gebildet: Cholsäure und Chenodesoxycholsäure. Im Darm werden diese primären Gallensäuren von Darmbakterien 7α -dehydroxyliert und dadurch zu sekundären Gallensäuren umgewandelt (Cholsäure zu Desoxycholsäure und Chenodesoxycholsäure zu Lithocholsäure).

Sowohl primäre als auch sekundäre Gallensäuren werden in der Leber mit Glycin oder Taurin konjugiert, Lithocholsäurekonjugate zum größten Teil sulfatiert.

In der Gallenflüssigkeit überwiegen Glycinkonjugate, und nur wenige Prozent liegen unkonjugiert vor. (Lentner 1977)

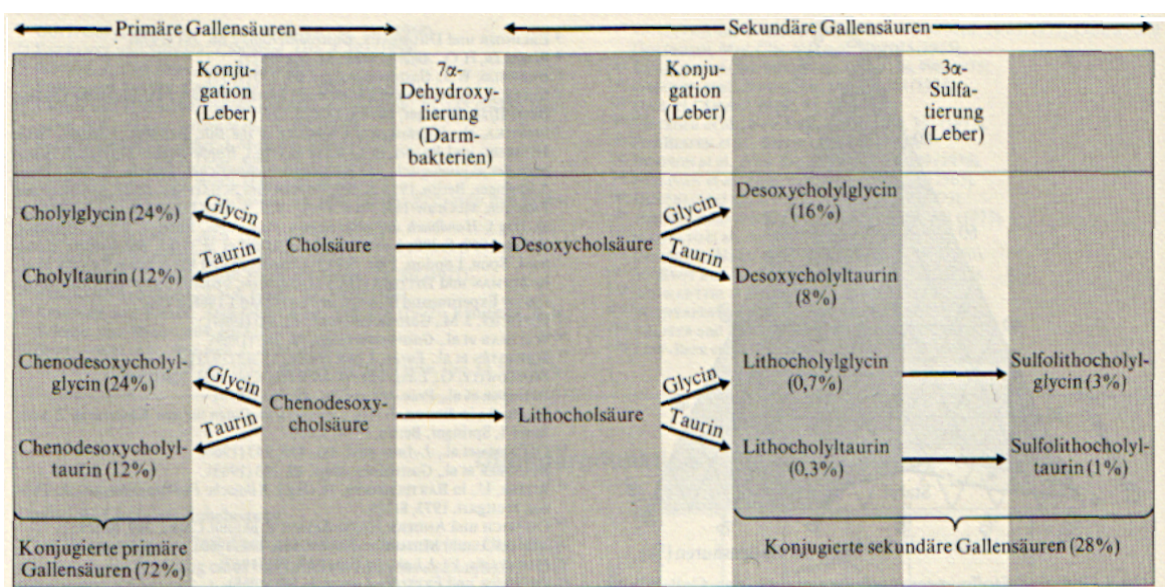


Abb.1: Gallensäurenstoffwechsel und relativer Anteil der einzelnen Komponenten an den gesamten konjugierten Gallensäuren (Hofman 1976)

Unkonjugierte Gallensäuren sind stark lipophil. Lithocholsäure, als die lipophilste Gallensäure im Menschen, ist nahezu wasserunlöslich.

Durch die Hydroxylierung mit Glycin oder Taurin werden Gallensäuren hydrophiler, vereinfacht gesagt umso mehr, je mehr Seitenketten sie besitzen. Der pKa-Wert unkonjugierter Gallensäuren liegt bei 5.0, der von Glycin-Konjugaten bei 3.8 und von Taurin-Konjugaten unter 1.0.

Unkonjugierte Gallensäuren sind somit unlöslich, wenn der pH unter 6 bis 7 fällt, während Glycin-Konjugate bis zu einem pH von 4 bis 5 löslich bleiben. Die physiologische Bedeutung der unterschiedlichen Löseeigenschaften von Gallensäuren ist nicht vollständig geklärt. Vermutet wird, dass durch das Überwiegen von hydrophileren Gallensäuren eine zu hohe passive Absorption der Gallensäuren in den Gallenwegen und im Dünndarm verhindert wird, da sie sich überwiegend in Lösung befinden. So kann eine hohe intraluminale Konzentration im Darm erreicht werden, die zur Fettverdauung benötigt wird. (Hofman 1988)

Darüberhinaus ist, wie bereits im Abschnitt 1.2.2. erwähnt, die Schädlichkeit hydrophober Gallensäuren für das Gallengangsgewebe bekannt

Ein gesunder Erwachsener synthetisiert täglich etwa 1mmol Cholsäure und 0,5mmol Chenodesoxycholsäure, während die tägliche Sekretion von Gallensäuren (unter Einbeziehung der enterohepatisch zirkulierenden Gallensäuren) bei 30-60mmol liegt. (Lentner 1977)

Dies wird ermöglicht durch einen sehr hohen first-pass-effect von Gallensäuren in der Leber. Dank dieses Effektes bleiben die Serumanteile von Gallensäuren stets $<10\mu\text{mol/l}$, während die intestinale Absorptionsrate während der Verdauung bei durchschnittlich $100\mu\text{mol/min}$ liegt. Hofmann bezeichnet die Leber daher – von einem funktionalen Standpunkt aus – als Pumpstation für Gallensäuren vom Blut in die Gallenflüssigkeit. (Hofman 1988)

Tatsächlich besitzt die Leber eine komplexe Regelungsfunktion, bestehend aus „Pumpfunktion“ und Synthesefunktion – die Syntheserate an Gallensäuren wird von der Leber bedarfsgerecht gesteuert.

Gerade der hohe first-pass-effect ist jedoch von großer medizinischer Bedeutung, wenn es um die externe Zufuhr von Gallensäuren geht, da er unter anderem auch eine schnelle Zufuhr intravenös oder als Tabletten gegebener Gallensäuren in die Leber und in die Gallenflüssigkeit ermöglicht.

1.3.2. Tauroursodesoxycholat (TUDC)

TUDC ist das Taurin-Konjugat von Ursodesoxycholat (UDC). Beide sind aus Chenodesoxycholat entstehende Gallensäuren, die in menschlicher Galle zu einem geringen Anteil natürlich vorkommen. Ihr Anteil kann durch externe Zufuhr erheblich gesteigert werden – bei oraler Gabe in therapeutischen Dosen (750mg/Tag) wird TUDC zur dominierenden Gallensäure in der Gallenflüssigkeit.

Seit längerem ist ein positiver Einfluss von UDC und TUDC auf zahlreiche Lebererkrankungen bekannt. Leuschner et al. verabreichten Mitte der 1980er Jahre UDC zur Lösung von Gallensteinen in Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis. Im Rahmen dieser Untersuchung stellten sie z.T. dramatisch verbesserte Leberfunktionswerte fest, die zu vielfältigen weiteren Untersuchungen geführt haben. (Leuschner et al. 1985)

In einer umfangreichen kanadischen Studie wurde 1994 die Wirkung von UDC auf Patienten mit PBC untersucht. Hierbei zeigten sich signifikante Verbesserungen der Leberfunktionsparameter in UDC-behandelten Patienten gegenüber der Kontrollgruppe. Allerdings bewirkte UDC keine subjektive Verbesserung in symptomatischen Patienten, und trotz besserer histologischer Befunde in UDC-behandelten Patienten verbesserte UDC nicht das outcome hinsichtlich der primären Behandlungsendpunkte Lebertransplantation oder Tod des Patienten. (Heathcote et al. 1994)

Heuman et al. zeigten einen protektiven Effekt von UDC (sowie einen auffallenden („striking“) protektiven Effekt von TUDC) gegen die bekannten toxischen Eigenschaften hydrophober Gallensäuren in Ratten-Hepatocyten und menschlichen Erythrocyten. (Heuman et al. 1991) Einen ähnlichen Effekt beschrieben Galle et al. kurz zuvor auch in menschlichen Hepatocyten. (Galle et al. 1990)

Dass Tauroursodesoxycholat erheblich stärkere erwünschte Effekte erzielt, als UDC, konnten Rodrigues et al. in einem Rattenmodell zeigen: in Ratten, die TUDC erhalten hatten, waren die Bildung und Konzentration von hydrophoben Gallensäuren in Leber, Blut und Faeces stärker reduziert, hydrophile Gallensäuren dagegen erhöht. (Rodrigues et al. 1995)

Für die positiven Effekte von UDC und TUDC in der Therapie cholestatischer Lebererkrankungen werden zwei wesentliche Ursachen diskutiert. Zum einen die mögliche Reduktion oder Verdrängung von hydrophoben Gallensäuren an verschiedenen Stellen des Gallensäurestoffwechsels, zum anderen direkte, membranstabilisierende Effekte von UDC und TUDC am Zellgewebe, die die Zellen weniger anfällig für die membranlösenden Einflüsse der hydrophoben Gallensäuren machen. (Heuman 1993; Güldütana et al. 1993) Die genauen Effekte in der Zellmembran sind jedoch bis heute nicht aufgeklärt.

Aufgrund der beschriebenen positiven Einflüsse ist TUDC heute ein etablierter Bestandteil der Therapie zahlreicher cholestatischer Zustände und Erkrankungen, wie z.B. der Primären Biliären Zirrhose, der Primären Sklerosierenden Cholangitis, pädiatrischen cholestatischen Störungen oder medikamenten-induzierten Cholestasen.

1.3.3. Einsatz von TUDC in der Lebertransplantation

Nachdem sich TUDC als vorteilhaft in der Behandlung hepatologischer Patienten erwiesen hatte, und sich gleichzeitig die Erforschung der Ursachen von Präservations- und Reperfusionsschäden des Gallentraktes bei Lebertransplantationen vermehrt anderen Faktoren als der Ischämiezeit zuwandte, wurde in den letzten Jahren auch die mögliche Verwendung von TUDC im Bereich der Lebertransplantation Gegenstand der Forschung.

Friman and Svanvik beschrieben die Verabreichung von UDC an Patienten nach Lebertransplantationen. Es kam zu deutlich weniger akuten Transplantatabstoßungen, allerdings gegenüber einer historischen Kontrollgruppe, so dass die Ergebnisse nur bedingt weitergehende Schlüsse zuließen. (Friman, Svanvik 1994)

Ein Jahr später konnten Hertl et al. zeigen, dass histologische Schäden am Gallengewebe von Schweinelebern direkt mit der Konzentration von Gallensäuren im Gallengang zum Zeitpunkt des Spülens korrelierten, und dass diese Schäden durch Infusion mit hydrophoben Gallensäuren vor der Leberentnahme induziert werden konnten, während Infusion von hydrophilen Gallensäuren vor der Organentnahme das Gallengewebe schützte. Dieser Schutz trat zu einem gewissen Grade selbst dann ein, wenn hydrophile und hydrophobe Gallensäuren gleichzeitig infundiert wurden und die Lebern erheblichen Kalt-Lagerungszeiten (20 Stunden) ausgesetzt waren. (Hertl et al. 1995)

In einem Rattenmodell konnten Hertl et al. später darüber hinaus zeigen, dass die Infusion von UDC vor der Leberentnahme auch die Hepatocytenfunktion schützt. Leberfunktionswerte waren post operationem signifikant weniger erhöht, als in der Kontrollgruppe. (Hertl, Engelhardt et al. 1997)

Ebenfalls in einem Rattenmodell wurden die Auswirkungen einer Infusion hydrophiler Gallensäuren zum Zeitpunkt der Reperfusion untersucht. Auch hierbei zeigten sich signifikant weniger erhöhte Leberfunktionswerte und eine zeitweise signifikant höhere Gallenproduktion in der Versuchsgruppe. (Hertl, Clausnitzer et al. 1997)

Die Befunde der zuletzt genannten Studien konnten von Hertl et al. nochmals in einem *in vivo* Transplantationsmodell bestätigt werden. Nach der Transplantation von Schweinelebern wurden über 7 Tage signifikant bessere Leberfunktionswerte, Gallenfluss und Gallensekretionsrate in der Versuchsgruppe – mit TUDC Infusion vor Entnahme und nach Reperfusion - gemessen. (Hertl, Hertl, Malago et al. 1999; Hertl, Hertl, Kunkel et al. 1999) Im Rahmen dieser Studie gelang auch erstmals eine elektronenmikroskopische Darstellung der ischämischen Schäden am Gallengangsepithel während der Lagerungsphase. Die hierbei gewonnen Aufnahmen zeigen eindrucksvoll, wie bei mit TUDC geschützten Epithelien auch nach 16 Stunden Lagerungszeit noch normale Zellverbände vorherrschten, während ungeschütztes oder mit hydrophoben Gallensäuren infundiertes Gewebe zu diesem Zeitpunkt bereits schwer geschädigt war. (Hertl et al. 2000)

Weitere Studien aus den letzten Jahren belegen die positiven Auswirkungen von TUDC in der perioperativen Phase der Lebertransplantation. Im Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass TUDC die Hepatozyten-Apoptose im Rahmen der Ischämie-/ Reperfusionsschäden vermindert. (Ishigama et al. 2001)

Am Menschen wurde gezeigt, dass per os zugeführte UDC signifikant bessere Leberfunktionsparameter (ALT) während der ersten fünf postoperativen Tage und eine hydrophilere Gallenzusammensetzung während der ersten drei postoperativen Tage zur Folge hatte (Soderdahl et al. 1998), sowie dass im Rahmen der Transplantation intra-portal infundierte oder durch UW-Lösung eingespülte TUDC einen positiven Effekt auf Leberfunktionsmarker, histologische und elektronenmikroskopische Befunde hat. (Falasca et al. 2001)

Aufgrund der genannten Forschungsarbeiten sind die Vorteile der TUDC im Hinblick auf perioperative Resultate (Leberfunktionsparameter, Gallenzusammensetzung, -fluss und -sekretionsrate, Histologie) unbestritten.

In der Literatur finden sich jedoch keine Angaben, ob mit diesen verbesserten Operationsergebnissen auch ein verbessertes Gesamtüberleben, niedrigere Komplikationsrate oder bessere Wirtschaftlichkeit verbunden sind.

Einzig in einer Studie von Angelico et al. wird auf langfristiges Outcome eingegangen, allerdings im Hinblick auf die orale TUDC-Gabe für ein Jahr vom fünften postoperativen Tag an. Die Studie kommt zu dem Schluß, dass die Gabe von TUDC sicher ist, jedoch keine Auswirkungen auf Graft-Funktion oder -überleben hat. (Angelico et al. 1999)

1.4. Fragestellung

Aufgrund der vorhandenen Forschungsergebnisse kann es als gesichert gelten, dass die intravenöse Gabe von TUDC vor Entnahme der Leber und nach Reperfusion im Körper des Organempfängers signifikante erwünschte Effekte auf das Gallengangsgewebe des transplantierten Organs hat – Leberfunktionswerte sind weniger erhöht, die Gallensekretionsrate und der Gallenfluß verbessert, histologische und elektronenmikroskopische Schnitte zeigen ein erheblich weniger geschädigtes Epithelgewebe.

Bislang nicht hinreichend geklärt ist jedoch, auf welchem Wege diese Resultate entstehen. Das Wissen über die Vorgänge innerhalb der Leber während der Entstehung von Ischämie- und Reperfusionsschäden und bei Verabreichung von hydrophilen oder hydrophoben Gallensäuren ist nach wie vor begrenzt.

Bekannt ist, dass hydrophobe Gallensäuren direkt schädlich auf das Zellgewebe wirken, hydrophile Gallensäuren hingegen membranstabilisierend, und damit protektiv wirken.

Bekannt ist weiterhin, dass die Verabreichung hydrophiler Gallensäuren für einen gewissen Zeitraum die Konzentration von Gallensäuren in Serum und Stuhl verändert, indem die verabreichte hydrophile Gallensäure zur dominanten Säure im Gallenpool wird.

Für die Effekte bei der perioperativen Gabe von TUDC sind daher folgende Mechanismen denkbar:

- ein direkter schützender Einfluß von TUDC auf das Zellgewebe;
- eine Verminderung hydrophober Gallensäuren in der Galle;
- eine Vermehrung hydrophiler (TUDC und/oder anderer) Gallensäuren in der Gallenflüssigkeit.

Dies wirft folgende Fragen auf:

- 1) Erreicht i.v. infundiertes TUDC in signifikanter Menge durch die Galle den Wirkort, das Gallengangsepithel?
- 2) Wird i.v. infundiertes TUDC, ähnlich wie bei der oralen Verabreichung in der Therapie cholestatischer Lebererkrankungen, zur dominanten Gallensäure in der Zusammensetzung der Galle?

- 3) Ändert sich durch die Infusion von TUDC die Konzentration anderer hydrophiler Gallensäuren, die ebenfalls einen protektiven Effekt auf die Zellen besitzen könnten?
- 4) Wird durch die i.v. Infusion der hydrophilen Gallensäure TUDC eine Verdrängung der hydrophoben Gallensäuren bewirkt, d.h. verringert sich die Konzentration hydrophober Gallensäuren in der Gallenflüssigkeit?

Bislang finden sich in der Literatur keine Arbeiten, die sich mit der Konzentration von Gallensäuren im unmittelbaren postoperativen Verlauf nach Lebertransplantation und der Verabreichung von TUDC beschäftigen.

Ziel dieser Studie war daher die Beantwortung oben genannter Fragen, um so ein besseres Verständnis der protektiven Eigenschaften von TUDC zu ermöglichen.

Das Modell Lebertransplantation beim Schwein bietet sich zur Beantwortung dieser Fragen an, da die Anatomie und Physiologie der Leber des Schweines große Ähnlichkeit mit der menschlichen Leber besitzen, und somit weitreichende Rückschlüsse auf Vorgänge im menschlichen Körper möglich sind.

1.5. Wahl des Untersuchungsverfahrens

Zur Gallensäureanalyse beschrieben sind vor allem chromatographische, aber auch enzymatische, radioimmunologische und elektrochemische Methoden. (Scalia 1995; Roda et al. 1998; Lee et al. 1997)

Elektrochemische Verfahren sind durch ungenügende Spezifität und Reproduzierbarkeit, aber auch ihre technische Komplexität gekennzeichnet. Enzymatische Methoden messen Gesamtgallensäurekonzentrationen oder zumindest Gruppen von chemisch ähnlichen Gallensäuren, so daß eine Unterscheidung einzelner Komponenten nur schlecht möglich ist. Immunologische Verfahren vermögen nur einen Teil der Gallensäuren sicher zu bestimmen, sind durch Kreuzreaktivität mit weiteren Bestandteilen der Gallenflüssigkeit störanfällig (Scalia 1995) und erwiesen sich als vergleichsweise ungenau. (Nakayama 1988)

Als eine noch relativ neue, sehr fortschrittliche Analysemethode gilt demgegenüber die kapilläre Elektrophorese, die bei hoher Zuverlässigkeit als besonders zeit- und kosteneffektiv gilt (Lee et al. 1997), jedoch bislang vor allem an reinen Gallensalzlösungen, kaum aber an komplexen biologischen Flüssigkeiten beschrieben wurde, und somit noch nicht als Routineverfahren gelten kann. (Roda et al. 1998)

Es haben sich daher vor allem die chromatographischen Verfahren, insbesondere die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) und die Gaschromatographie (GC) als Methoden der Wahl zur Analyse von Gallensäuren etabliert. Hierbei ist die HPLC die in der Regel bevorzugte Methode, da sie in der Probenvorbereitung weniger aufwendig ist und zumeist einen geringeren Zeitbedarf hat. (Scalia 1995; Roda et al. 1998; Hamilton, Comai 1988)

Neben den allgemeinen Erwägungen, die die HPLC zur vielgenutzten Meßmethode bei Gallensäuren gemacht haben, erwies sich dieses Verfahren als besonders geeignet für diese Untersuchung, da die Retentionszeiten einer Gallensäure in der HPLC-Analyse mit den hydrophilen/hydrophoben Eigenschaften dieses Stoffes korrelieren. (Armstrong, Carey 1982) Gerade diese Eigenschaften sind im Hinblick auf die Fragestellung von größtem Interesse.

Dementsprechend wurde für diese Untersuchung das von Armstrong und Carey beschriebene Verfahren, modifiziert nach Hertl et al., angewendet. (Armstrong, Carey 1982; Hertl et al. 1995)

2.Material und Methoden

2.1. Versuchskonzeption

Im Rahmen von Lebertransplantationen zwischen Schweinen wurde in der Versuchsgruppe (n=6) während des Explantationsvorganges sowie nach Reperfusion im Empfänger TUDC i.v. infundiert. In der Kontrollgruppe (n=6) wurde stattdessen 0,9% Kochsalzlösung infundiert.

Nach erfolgter Transplantation entnommene Gallenflüssigkeitsproben wurden im Labor auf ihre Zusammensetzung hin untersucht.

2.2. Probengewinnung

2.2.1. Versuchstiere

Die Lebertransplantationen wurden zwischen 12 Paaren von Landschweinen (25-34 kg) vorgenommen. Die Zuordnung zu einer der beiden Gruppen erfolgte nach dem Zufallsprinzip.

Bei den Schweinen eines Transplantationsvorganges handelte es sich stets um Geschwisterpaare, um so möglichst passende graft/host-Verhältnisse zu schaffen, was insbesondere eine Immunsuppression auf niedrigem Niveau ermöglichen sollte.

Das Tierversuchsprotokoll zur Verwendung von Landschweinen wurde vom Amt für Gesundheits- und Veterinärwesen der Freien und Hansestadt Hamburg unter der Genehmigungsnummer 23/95, sowie von der Ethikkommission der Universität Hamburg genehmigt. Die Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes, sowie die Prinzipien zur Behandlung von Labortieren der NIH (NIH publication No.86-23) wurden eingehalten.

2.2.2. Präoperative Maßnahmen

Die zur Operation vorgesehenen Versuchstiere hielten sich vor der Operation bereits mindestens 1 Woche in der Versuchstierhaltung auf und wurden mit Standard-Schweinefutter bis zum Abend vor der Operation gefüttert. Wasser stand den Tieren bis direkt vor der Narkoseeinleitung frei zur Verfügung.

2.2.3. Narkoseeinleitung

Die Versuchstiere wurden mit einer einmaligen intramuskulären Injektion von Acepromazin, Midazolam und Ketamin narkotisiert, in den Operationsraum überführt, endotracheal intubiert und maschinell beatmet. Zur Aufrechterhaltung der Narkose diente eine intravenöse Infusion von Dormicum und Ketamin, gelöst in NaCl.

2.2.4. Hepatektomie beim Spender

Zur Explantation wurde zunächst das Abdomen durch eine Transversalinzision eröffnet (Chevron incision), die in der Linea Alba bis zum Xiphoid hochgeführt wurde. Die Leber wurde freigelegt und die A.hepatica, Pfortader, infrahepatische V.cava, sowie die Aorta abdominalis distal der A.mesenterica inf. isoliert. Anschließend erfolgte eine Ligatur des Ductus cysticus nahe der Gallenblase.

Zur Entnahme von ca. 900ml Vollblut, das zum späteren Einsatz im Rahmen der Replantation aufbewahrt wurde, wurde die Aorta punktiert, anschließend erhielt das Schwein 10.000 iE Heparin. Nach Kanülierung der abdominalen Aorta mit einem 18Ch Spülkatheter, Durchtrennung der suprahepatischen V.cava und Verschluss der thorakalen Aorta begann das Durchspülen der Leber mit insgesamt 1l 0-1°C warmer UW-Lösung. Darüber hinaus diente gefrorene, zu Krümeln zerkleinerte NaCl-Lösung der schnellen Organabkühlung.

Zur Entfernung der Gallenflüssigkeit aus den größeren Gallengängen wurden auch die Gallengänge nach Leberdissektion mit 20ml UW-Lösung gespült, und zwar retrograd über den Ductus choledochus.

Nach der unmittelbar folgenden Leberentnahme wurde das Organ doppelt eingepackt in zwei Plastikbeuteln in Eiswasser gelagert. Die Pfortader wurde mit weiteren 200ml eiskalter UW-Lösung durchspült, anschließend wurden die Lebergefäße für die Replantation vorbereitet: die zwerchfellnahen Venen wurden übernäht und eine Manschette an der infrahepatischen V.cava angebracht. Hierzu diente ein ca. 1cm langes Teilstück einer 5ml Spritze, über das der Gefäßstumpf gezogen wurde.

Abschließend wurde eine Cholecystektomie durchgeführt.

Bis zur Implantation in das Empfängertier wurde das Organ in sterilen „Lahey“-Tüten verwahrt (doppelt eingepackt), umgeben von kalter Kochsalzlösung und eiskalter UW-Lösung.

Die Gesamtpräservationszeit (bestehend aus kalter und warmer Ischämiezeit) betrug bei allen ausgewerteten Versuchen 8 Stunden.

2.2.5. Implantation beim Empfänger

Prämedikation, Narkose und Beatmung entsprechen dem Verlauf beim Leberspender, allerdings wurden den Empfängerschweinen zusätzlich Katheter in die V.jugularis externa und A.carotis externa eingeführt, um intraoperativ den Zentralvenendruck und den arteriellen Blutdruck messen zu können. Der ZVK diente darüber hinaus auch der Blutentnahme und i.v.-Medikamentengabe im weiteren postoperativen Verlauf.

Bevor die Spenderleber eingesetzt werden konnte, mußte erst die eigene Leber des Empfängers entfernt werden. Zunächst wurde hierzu die linke V.jugularis interna freigelegt, über die später der veno-venöse Bypass verlaufen sollte. Wie schon beim Spendertier wurde über eine verlängerte Chevron-Inzision der Bauchraum eröffnet und durch Retraktoren weit genug für die Darstellung der Leber offen gehalten. Die

A.hepatica, V.portae, Vv.cavae sup. et inf. beim Empfängertier wurden möglichst lebernah abgesetzt, um so ausreichend lange Endstücke für die End-zu-End-Anastomosen zu erhalten.

Anschließend erfolgte eine Antikoagulation mit 3000iE Heparin und die Herstellung des veno-venösen Bypasses. Hierzu wurden zunächst die infrahepatische V.cava und die Pfortader abgeklemmt und durchtrennt, dann die leberfernen Enden kanüliert und über einen Y-Konnektor mit der linken inneren Jugularvene verbunden.

Nach Abklemmung und Durchtrennung von suprahepatischer V.cava und der A.hepatica wurde die Leber entfernt. Ab diesem Zeitpunkt wurden – bis zur Reperfusion des Transplantationsorganes – alle anästhetischen Infusionen unterbrochen.

Zur Implantation wurde die bis dahin eisgekühlte Spenderleber im rechten oberen Quadranten des Empfängertieres plziert. Die Anastomosen erfolgten in folgender Reihenfolge, durchweg mit absorbierbarem Monofilamentnahtmaterial:

zunächst wurde die suprahepatische V.cava anastomosiert (4-0 PDS), dann die A.hepatica (7-0 PDS) und schließlich die Pfortader (5-0 PDS). Vor der Vollendung der Pfortaderanastomose wurde ein 6Fr Spülkatheter in die Pfortader eingebracht, über den die Leber mit 500ml kalter Ringer-Lactat-Lösung gespült wurde.

Anschließend wurde die Pfortaderanastomose vollendet und die noch abgeklemmten Gefäße wurden nacheinander eröffnet: zunächst die suprahepatische V.cava, dann die V.portae, zuletzt – um so die warme Ischämiezeit möglichst kurz zu halten – die A.hepatica.

Nach vorsichtiger Wiederherstellung der Hämostase wurde die infrahepatische V.cava mittels Cuff-Technik anastomosiert.

Der Ductus choledochus communis wurde ebenfalls – unter Verwendung von 5-0 Vicryl-Nahtmaterial – End-zu-End anastomosiert. Hierbei wurde eine zum Rücken des Tieres getunnelte T-Drainage (2,5mm Außendurchmesser) distal der Nahtstelle eingebracht, über welche die Gallenproben entnommen werden konnten.

Nach Überprüfung der Hämodynamik wurde das Abdomen in drei Lagen verschlossen, hierzu dienten unterbrochene absorbierbare Nähte, sowie Nylonfaden für die Hautnaht.

2.2.6. Postoperative Maßnahmen

Die operierten Tiere wurden zunächst weiterbeatmet und erst nach Wiedereinsetzen der Spontanatmung und ihrem Erwachen extubiert.

Zur weiteren Auswertung des Projektes wurden sie für bis zu einem halben Jahr in den Räumlichkeiten der Versuchstierhaltung gehalten und schließlich unter Narkose getötet.

2.2.7. TUDC/NaCl-Infusionen

Die intravenöse Infusion von TUDC erfolgte in der Versuchsgruppe

- während des Explantationsvorganges nach der Ligatur des Ductus cysticus über einen Zeitraum von 20 min in einer Konzentration von $2\mu\text{mol/kgKG/min}$ über eine Ohrvene;

- beim Empfänger beginnend zum Zeitpunkt der Reperfusion der Leber bis zur Extubation des Tieres (max. über 400 min) mit einer Konzentration von $0,2\mu\text{mol/kgKG/min}$ zentralvenös.

In der Kontrollgruppe wurde statt TUDC eine 0,9% Kochsalzlösung infundiert, beim Spendertier mit einer Infusionsrate von $1,25\text{ml/min}$ für 20min, beim Empfängertier mit 15ml/h bis zur Extubation (max. über 400 min).

2.2.8. Probenentnahme

Eine halbe Stunde nach Reperfusion, sowie danach stündlich bis zum Erwachen des Schweins aus der Narkose wurden über die eingeführte Drainage Gallenproben entnommen. Weitere Proben folgten entsprechend dem postoperativen Verlauf in den folgenden Tagen.

Alle entnommenen Gallenproben wurden bis zu ihrer Analyse bei -80°C aufbewahrt.

2.2.9. Immunsuppression

Zur Gewährleistung eines erfolgreichen Transplantationsverlaufes wurden die betroffenen Empfängertiere immunsupprimiert. Am Tag vor der Operation erhielten sie 5mg/kg KG Cyclosporin (CyA, Optoral, Sandoz). Während der Operation wurden 100mg Dexamethason in der anhepatischen Phase verabreicht. Postoperativ erhielten die Versuchstiere täglich mit ihrer Nahrung 5mg/kg KG Cyclosporin, ab dem 10.postoperativen Tag 3mg/kg KG.

Der Cyclosporinspiegel im Blut der Versuchstiere wurde zwischen 50µg/l und 150µg/l gehalten.

2.3. Laborbearbeitung

2.3.1. Verwendetes Gerät

Eingesetzt wurde eine Beckman (Fullerton, CA, USA) „System Gold“ HPLC–Chromatographie-Anlage, bestehend aus

- Injektor 210A
- Pumpe 126
- Detektor 166
- PC (IBM) und Drucker (Epson)

Als stationäre Phase diente eine 250x4,6mm Octadecylsilane (ODS) – Reverse-phase-Säule (C18) mit 5µm Partikelgröße.

Die mobile Phase bestand aus einem Methanol/Wasser-Gemisch (im Verhältnis 74/20), und 15mmol/l NaOH. Diese Lösung wurde mit 85% Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 2,1 titriert. (Alle hierfür verwendeten Reagenzien HPLC-Grade von Merck, Darmstadt).

Die Flußrate wurde auf 1ml/min eingestellt. Die Messdauer betrug 12 Minuten. Die Extinktionsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 210nm.

Pro Messung wurden über den Injektor 10µl der zu messenden Substanz injiziert.

Die Umrechnung der Messergebnisse in Gallensäurekonzentrationen erfolgte mithilfe des zum „System Gold“ gehörenden PC und der Software, Version 7.11.

2.3.2. Herstellung von Gallensäure-Standardlösungen

Folgende Gallensäuren wurden zur Herstellung von Standards verwendet und konnten unter der beschriebenen Meßmethode sicher bestimmt werden: Dehydrocholat (DHC), Tauroursodseoxycholat (TUDC), Taurocholat (TC), Glycocholat (GC), Taurochenodesoxycholat (TCDC), Taurodesoxycholat (TDC), Glycochenodesoxycholat (GCDC), Glycodesoxycholat (GDC), Tauroolithocholat (TLC), Glycolithocholat (GLC), Hyodesoxycholat (HDC) und Hyocholat (HC). (Bezogen in hochreiner Form von CalBiochem, La Jolla, CA, USA; Sigma, St.Louis, MO, USA)

Für Einzelstandards wurden 0,1mmol eines Gallensalzes in jeweils 10ml Methanol (Merck, Darmstadt), entsprechend einer Konzentration von 10mmol/l, gelöst.

Darüber hinaus wurde eine Kontrollmischung aus allen verwendeten Gallensäuren hergestellt, indem jeweils 0,01mmol der Gallensalze in 10ml Methanol gelöst wurden, entsprechend einer Konzentration von 1mmol/l.

2.3.3. Standardmessungen

Um den Fehler durch Messungenauigkeiten zu verringern, wurden von jedem Gallensalz zwei gleiche Standardlösungen hergestellt und jeweils zweimal gemessen. Die Ergebnisse dieser Messungen wurden gemittelt.

Die Variation der einzelnen Messergebnisse gegenüber dem Mittelwert lag in allen Fällen unter 10%, so dass eine für die weitere Auswertung ausreichende Genauigkeit des Meßsystems gegeben war.

Nach Abschluss aller Messungen wurde die Ergebnisgenauigkeit noch einmal überprüft, indem die Standardlösungen erneut vermessen wurden.

2.3.4. Probenmessung

Die Gallenproben wurden bis kurz vor der Auswertung bei -80°C aufbewahrt und jeweils am Abend vor ihrer Ausmessung bei Kühlschranktemperatur aufgetaut.

Zur Messung wurden sie mit Methanol im Verhältnis $100\mu\text{l} : 900\mu\text{l}$ verdünnt.

Alle Proben wurden dreimal gemessen, die Messergebnisse für die weitere Auswertung gemittelt.

2.3.5. Ergebnisbearbeitung

Das HPLC-System lieferte als Messergebnisse Extinktions-Peaks, deren Flächen unter der Kurve, Peak Area, in Konzentrationen umgerechnet werden können.

Als Umrechnungsfaktor für die einzelnen Gallensalze diente jeweils der in den Standardmessungen ermittelte Quotient aus Konzentration und Peak Area.

Anhand der Ergebnisse der Standardmessungen konnte für den Konzentrationsbereich 1mmol/l bis 10mmol/l Proportionalität zwischen Peak Areas und Gallensalzkonzentrationen als gegeben betrachtet werden.

2.4. Statistische Analyse

Die im Labor ermittelten Daten wurden in mehreren Schritten mit SPSS statistisch ausgewertet.

Als Prä-Tests erfolgten K-S-Lilliefors-Tests und Mauchly-Tests.

Die Abweichung der Messwerte in den Teilstichproben von der Normalverteilung erwies sich im K-S-Lilliefors-Test trotz einer leichten Linksgipfeligkeit als nicht signifikant.

In den Fällen, in denen der Mauchly-Test Inhomogenität der Varianzen und Kovarianzen nachwies, erfolgte bei der weiteren Analyse eine Korrektur nach dem Huynh-Feldt-Verfahren.

Auf dieser Grundlage wurden dann 2faktorielle Varianzanalysen mit Messwiederholung auf einem Faktor durchgeführt. Faktoren waren zum einen die Messzeitpunkte, zum anderen die Experimental- und Kontrollgruppen.

Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten die Mittelwerte der Teilstichproben separat für jede einzelne Gallensäure auf signifikante Unterschiede untersucht werden, hinsichtlich

- des zeitlichen Verlaufs
- der Gruppenunterschiede über den gesamten Zeitraum
- der Verlaufstendenzen (Wechselwirkung Gruppe/Zeit)

Zur differenzierten Nachprüfung erfolgten Post-Tests, mit deren Hilfe die Messergebnisse zu Einzelzeitpunkten analysiert wurden.

Zur Anwendung kamen hier t-Tests zum Vergleich zwischen den Gruppen zu einem bestimmten Zeitpunkt, und LSD-Tests zum Erkennen von Unterschieden zwischen jeweils zwei Einzelzeitpunkten innerhalb einer Gruppe und einer Gallensäure.

Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 0,05$ angenommen, d.h. alle Ergebnisse mit einer α -Fehlerwahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ waren signifikant.

Alle im Ergebnisteil genannten Streuungsbereiche beziehen sich jeweils auf Mittelwert \pm eine Standardabweichung.

3. Ergebnisse

3.1. Operationsergebnisse

Weder im Operationsverlauf, noch in der postoperativen Überlebenszeit der Schweine gab es wesentliche Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe.

Das durchschnittliche Körpergewicht betrug $28,3\text{kg} \pm 3,4\text{kg}$ in der Versuchs- und $30,7\text{kg} \pm 2,3\text{kg}$ in der Kontrollgruppe. Das durchschnittliche Lebergewicht war $657\text{g} \pm 39\text{g}$ bei TUDC-infundierten Tieren, gegenüber $648\text{g} \pm 29\text{g}$ bei NaCl-infundierten Tieren. Die totale Ischämiezeit, vom Beginn der kalten Organkonservierung bis zur Reperfusion, betrug $481\text{min} \pm 19\text{min}$ bei der Versuchs- und $463\text{min} \pm 21\text{min}$ bei der Kontrollgruppe. Die „warme“ Ischämiezeit, also die Zeit, die zum Einnähen der transplantierten Leber benötigt wurde, betrug $61,8\text{min} \pm 3,7\text{min}$ (Versuchsgruppe), bzw. $65,3\text{min} \pm 4,9\text{min}$ (Kontrollgruppe).

Die Lebertemperatur betrug $1,2^\circ\text{C} \pm 0,9^\circ\text{C}$ bei Herausnahme der Lebern aus der kalten UW-Lösung und $28,9^\circ\text{C} \pm 2,0^\circ\text{C}$ kurz vor der Reperfusion, zum Ende der „warmen“ Ischämiezeit. Hierbei gab es keine gruppenspezifischen Unterschiede.

Von den 12 Organempfängern starben sechs zwischen dem vierten und 72. postoperativen Tag, die übrigen Schweine lebten gesund weiter.

In der Versuchsgruppe lag die 2-Wochen-Überlebensrate bei 67% (4/6), in der Kontrollgruppe bei 83% (5/6). Die Todesfälle waren bedingt durch ein akutes Atemversagen nach unerkanntem einseitigem Pleuraerguss (4. postoperativer Tag, Versuchsgruppe), sowie durch massive stresserosionsbedingte gastrointestinale Blutungen trotz postoperativer Omeprazol-Gabe (10. postoperativer Tag, Kontrollgruppe; 14. postoperativer Tag, Versuchsgruppe).

An der gleichen Ursache verstarb am 30. postoperativen Tag ein Tier der Kontrollgruppe. Zwei weitere Tiere aus der Versuchsgruppe verstarben bis zum 72. postoperativen Tag, zum einen intraoperativ nach einer Darmperforation, zum anderen durch Leberversagen bei occludierter A.hepatica durch eine anastomotische Strikture, in Kombination mit einer Ductus-communis-Stenose auf einem 2cm-Segment vor seiner Anastomose.

3.2.Laborergebnisse

3.2.1. Vorbemerkung

Im folgenden werden die Ergebnisse der Konzentrationsmessungen und nachfolgenden statistischen Analysen der einzelnen ausgewerteten Gallensäuren nacheinander dargestellt.

Die stündlichen Probenentnahmezeitpunkte nach der Reperfusion werden mit T1 bis T11 bezeichnet. T1 bezeichnet den Zeitpunkt 30min nach der Reperfusion. Die Entnahmezeitpunkte an den postoperativen Tagen werden mit P1 bis P14 bezeichnet.

In die statistische Analyse wurden die Proben der Zeitpunkte T1 – T5 nach der Reperfusion einbezogen. Die ausgewerteten Gruppengrößen waren für die Versuchsgruppe $n=5$ und für die Kontrollgruppe $n=4$. Drei Schweine wurden nicht berücksichtigt, da von ihnen keine vollständigen Probensätze für den ausgewerteten Zeitraum vorlagen.

Von den folgenden Zeitpunkten T6-P14 lagen – aufgrund der unterschiedlichen Aufwachzeitpunkte der Tiere und unregelmäßiger Entnahmemöglichkeiten in den Folgewochen – nur kleinere Stichproben, z.T. nur die Werte von einzelnen Tieren, vor. Dennoch sind auch die Messwerte der späteren Proben im Hinblick auf den längerfristigen Verlauf der Gallenzusammensetzung von Interesse und werden ebenfalls dargestellt, allerdings mit der Einschränkung, dass bei der kleinen Stichprobengröße zwar Tendenzen erkennbar werden, jedoch keinesfalls statistisch gesicherte Aussagen getroffen werden können.

3.2.2. Tauroursodesoxycholat (TUDC)

Zwischen den ersten fünf Proben zeigte sich bei der Gallensäure TUDC ein hochsignifikanter ($p < 0,001$) Verlaufsunterschied zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe. Die Versuchsgruppe zeigte nach der Reperfusion zunächst einen Konzentrationsabfall von $36,69 \pm 7,75$ mmol/l auf $28,67 \pm 6,27$ mmol/l bis zum Zeitpunkt T4, danach wieder einen leichten Konzentrationsanstieg bis auf $31,34 \pm 1,99$ mmol/l. Diese Werte lagen durchweg deutlich über denen der Kontrollgruppe, bei der die gemessene Konzentration über die gesamte Zeit nahezu konstant um 5mmol/l blieb.

Der deutliche Konzentrationsunterschied zwischen den beiden Gruppen ist nicht nur in der Varianzanalyse über den gesamten Zeitverlauf hochsignifikant unterschiedlich, sondern auch im t-Test zu allen Einzelzeitpunkten. ($p(T1,T4)=0,001$, $p(T2,T3,T5)=0,000$)

Signifikant war bei der Versuchsgruppe darüber hinaus im LSD-Test der Konzentrationsunterschied zwischen den Zeitpunkten T1/T4 und T1/T3.

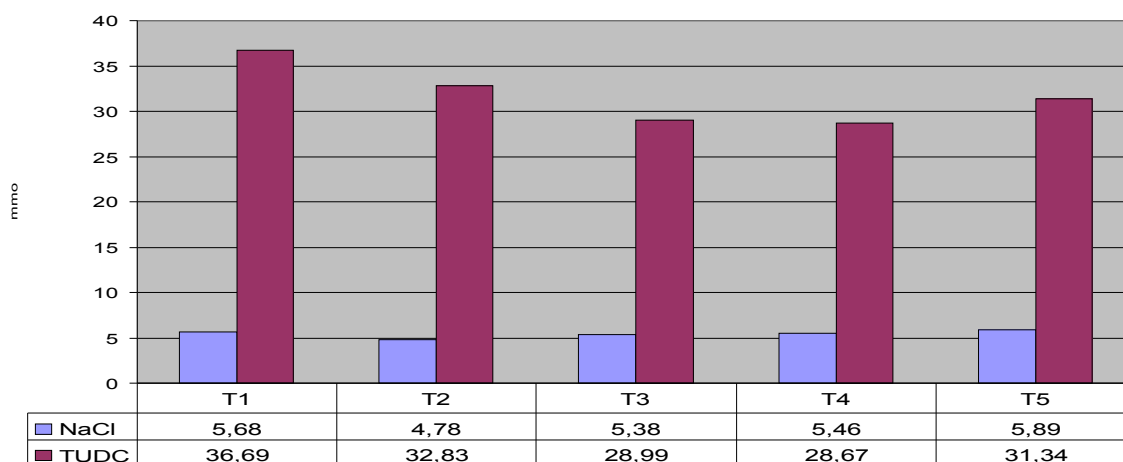


Abb.2: Konzentrationsverlauf TUDC (T1-T5) bei den in die Varianzanalyse einbezogenen Tieren ($p < 0,001$)

Im weiteren zeitlichen Verlauf zeigte sich in den gemessenen Proben beider Gruppen ab dem Zeitpunkt T6 (Versuchsgruppe), bzw. T7 (Kontrollgruppe) bis zum Ende der stündlichen postoperativen Probeentnahmen ein starker Abfall der TUDC-Konzentrationen, bei weiterhin höheren Konzentrationen in der Versuchsgruppe.

In den Proben der folgenden zwei Wochen blieben die TUDC-Konzentrationen - bis auf einen hohen Messwert von 26,73 mmol/l bei einem Schwein der Versuchsgruppe am 4.postoperativen Tag - auf einem niedrigen Niveau. Die Werte der Versuchsgruppe lagen dabei zumeist etwas höher.

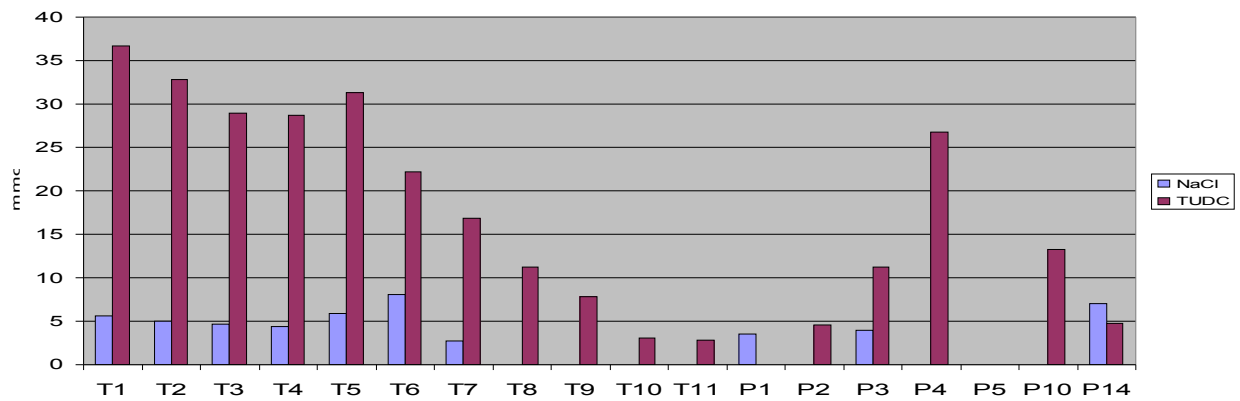


Abb.3: Konzentrationsverlauf TUDC (T1-P14) unter Einbeziehung aller Messergebnisse

3.2.3. Taurocholat (TC)

Die statistische Analyse der Messergebnisse von Taurocholat ergab einen hochsignifikanten Konzentrationsabfall ($p=0,001$) im zeitlichen Verlauf für alle operierten Tiere, jedoch keine signifikanten Verlaufsunterschiede zwischen den zwei Gruppen ($p=0,973$). Auch in den t-Tests fanden sich zu keinem Einzelzeitpunkt signifikante Gruppenunterschiede.

Zum Zeitpunkt T1 fanden sich durchschnittliche Konzentrationen von

$13,35 \pm 2,59$ mmol/l in der Kontroll- und $14,35 \pm 2,13$ mmol/l in der Versuchsgruppe. Bis zum Zeitpunkt T3 fielen diese Werte in der Kontrollgruppe ab auf $9,77 \pm 1,25$ mmol/l, bevor sie in den folgenden zwei Stunden nochmals unwesentlich auf $9,87 \pm 1,74$ mmol/l anstiegen, während sie in der Versuchsgruppe stetig abfielen auf $8,79 \pm 1,72$ mmol/l zum Zeitpunkt T5.

Der varianzanalytisch hochsignifikante Konzentrationsunterschied im zeitlichen Verlauf war auch im LSD-Test aufzufinden, hier zeigten sich in der TUDC-infundierten Gruppe jeweils signifikante Unterschiede zwischen dem Zeitpunkt T1 und allen weiteren Zeitpunkten (T2, T3, T4, T5), in der NaCl-infundierten Gruppe immerhin zwischen den Zeitpunkten T1/T3 und T1/T4.

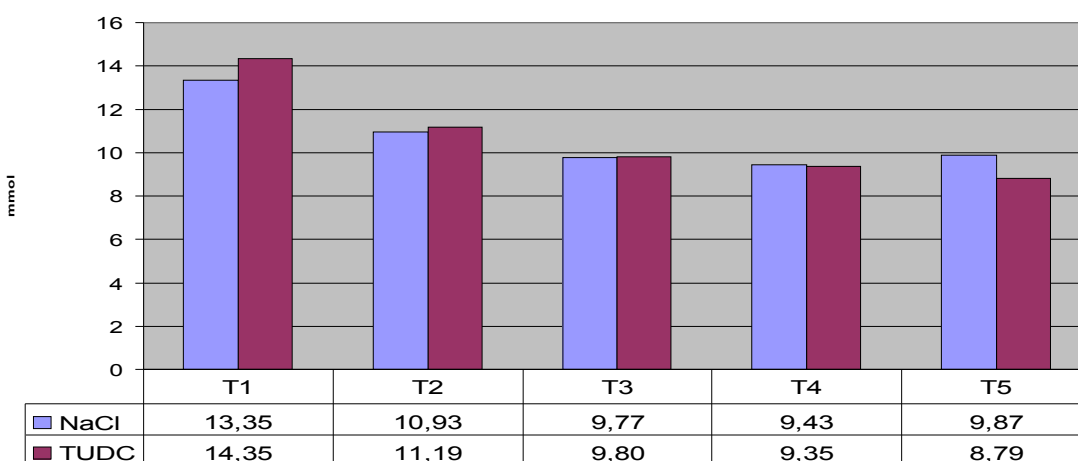


Abb.4: Konzentrationsverlauf TC (T1-T5) bei den in die Varianzanalyse einbezogenen Tieren ($p=0,973$)

Die Messungen der weiteren postoperativen Proben zeigten, dass es sowohl in der Versuchs-, wie auch in der Kontrollgruppe zu einem weiteren Konzentrationsabfall kam, auf Werte um 5 mmol/l zum Zeitpunkt T8, in der Versuchsgruppe sogar bis auf Werte um 3 mmol/l zu den Zeitpunkten T9-T11.

Die Proben der postoperativen Tage ergaben allerdings wieder einen Anstieg der gemessenen Konzentrationen, in der Kontrollgruppe von $5,75 \pm 0,12$ mmol/l am ersten

postoperativen Tag bis auf $9,6 \pm 4,86$ mmol/l zwei Wochen nach der Operation, in der Versuchsgruppe sogar auf Werte über 15 mmol/l am 10. und 14. postoperativen Tag.

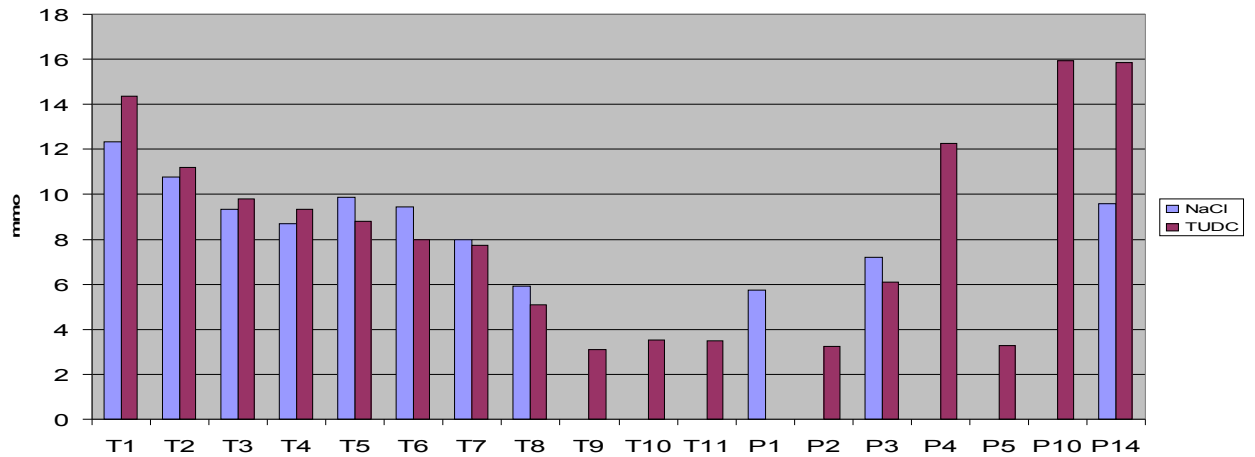


Abb.5: Konzentrationsverlauf TC (T1-P14) unter Einbeziehung aller Messergebnisse

3.2.4. Glycocholat (GC)

Die Glycocholat-Konzentrationen beider Gruppen sanken innerhalb der ersten 5 Proben signifikant ab ($p=0,008$), jedoch verlief dieser Konzentrationsabfall ohne signifikante Unterschiede zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe ($p=0,748$).

Insgesamt war dabei die Konzentrationsabnahme in der Versuchsgruppe noch ausgeprägter (von $27,28 \pm 9,65$ mmol/l zum Zeitpunkt T1 auf $14,60 \pm 2,93$ mmol/l zum Zeitpunkt T5, gegenüber einem Abfall von $25,52 \pm 9,52$ mmol /l zum Zeitpunkt T1 auf $17,34 \pm 5,05$ mmol/l zum Zeitpunkt T5 in der Kontrollgruppe).

Entsprechend finden sich in der TUDC-Gruppe signifikante Konzentrations-Unterschiede zwischen dem Zeitpunkt T1 und den Zeitpunkten T5/T4/T3 im LSD-Test, während sich in der NaCl-Gruppe keine signifikanten Unterschiede im Konzentrationsverlauf zeigten.

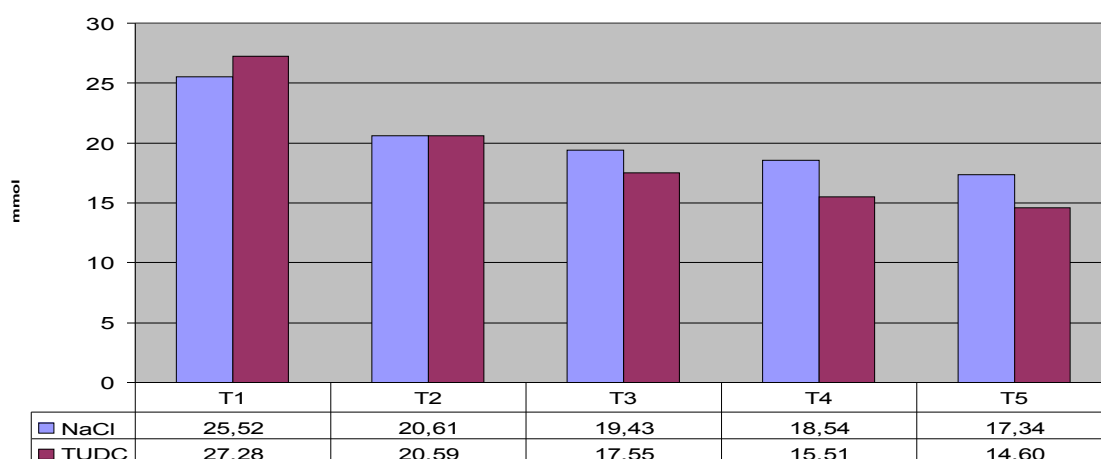


Abb.6: Konzentrationsverlauf GC (T1-T5) bei den in die Varianzanalyse einbezogenen Tieren ($p=0,748$)

In der Versuchsgruppe sank die Konzentration in den postoperativen Stunden weiter ab auf Werte um 9 mmol/l (T11). In den folgenden zwei Wochen verhielten sich die Messwerte uneinheitlich und schwankten zwischen recht niedrigen und sehr hohen Konzentrationen (P5: 4,13 mmol/l, P14: 48,23 mmol/l).

In der Kontrollgruppe sanken die Messwerte zunächst ebenfalls weiter ab auf 11,17 mmol/l (T8) und schwankten in den Folgewochen zwischen 5,72 mmol/l (P1) und 16,95 mmol/l (P3).

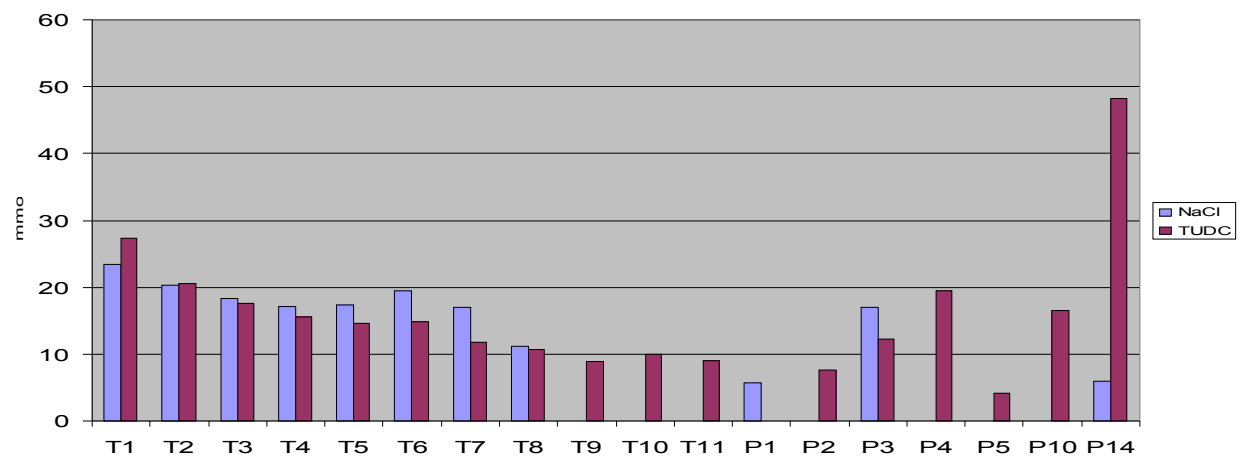


Abb.7: Konzentrationsverlauf GC (T1-P14) unter Einbeziehung aller Messergebnisse

3.2.5. Taurochenodesoxychololat (TCDC)

Die Varianzanalyse der Messwerte von TCDC zeigte einen sehr signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen NaCl- und TUDC-Gruppe ($p=0,017$).

Während in der Versuchsgruppe die Konzentration zwischen den Zeitpunkten T1 und T5 zwischen $10,21 \pm 1,95$ mmol/l und $11,67 \pm 1,23$ mmol/l lag, lagen die Konzentrationen in der Kontrollgruppe deutlich darüber zwischen $16,28 \pm 5,80$ mmol/l und $18,30 \pm 6,38$ mmol/l.

Die Kurvenverläufe zeigten dabei allenfalls einen schwachen Konzentrations-Anstieg oder –Abfall.

Zu den Einzelzeitpunkten zeigte sich in den t-Tests ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den Gruppen zum Zeitpunkt T2 ($p=0,048$), darüber hinaus annähernd signifikante Unterschiede zu den Zeitpunkten T1 ($p=0,088$) und T3 ($p=0,095$).

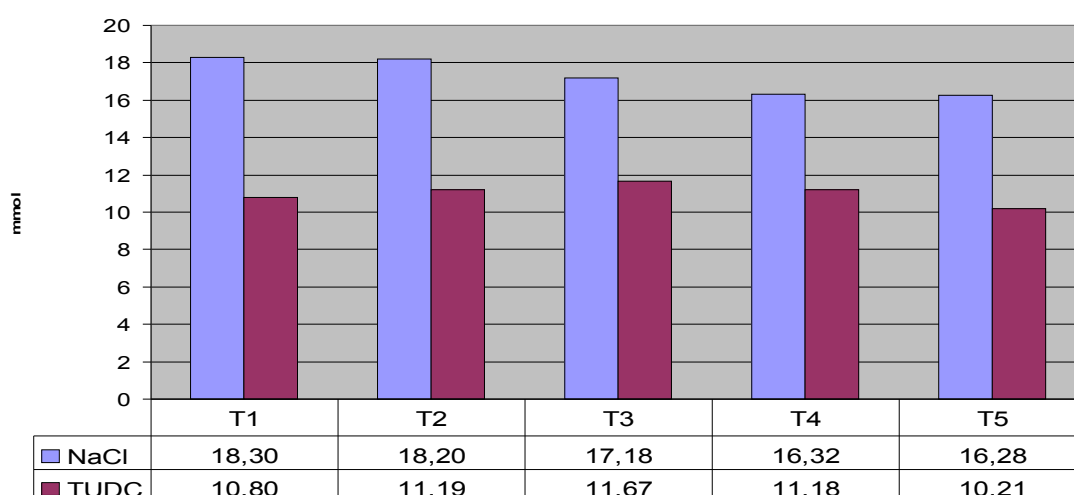


Abb.8: Konzentrationsverlauf TCDC (T1-T5) bei den in die Varianzanalyse einbezogenen Tieren ($p=0,017$)

Im weiteren Verlauf der stündlichen Messungen fielen die Konzentrationen der Versuchsgruppe leicht auf Werte um 9 mmol/l ab. In den folgenden Tagen lagen sie ebenfalls zumeist zwischen 8 mmol/l und 11 mmol/l, stiegen in einzelnen Messungen jedoch auch auf Werte über 20 mmol/l an.

Demgegenüber zeigte sich bei der Kontrollgruppe ein verstärkter Konzentrationsabfall nach dem Zeitpunkt T5, bis auf einen Wert von 8,50 mmol/l. An den postoperativen Tagen lagen die Konzentrationen mit 12,85 mmol/l, bzw. 13,43 mmol/l (P1, P3) noch über den bis dahin gemessenen Werten in der Versuchsgruppe, am Tag P14 jedoch mit 6,85 mmol/l recht niedrig.

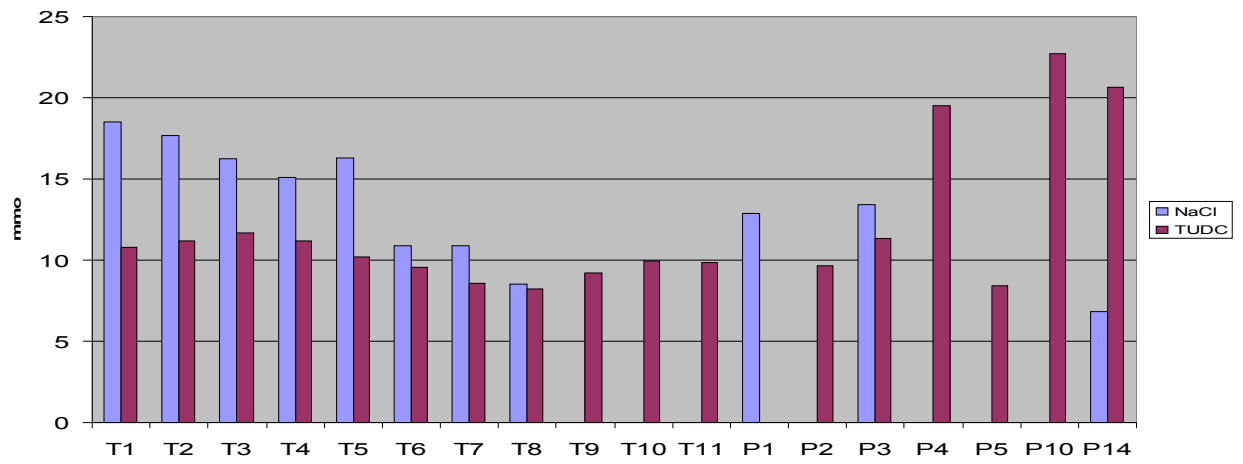


Abb.9: Konzentrationsverlauf TCDC (T1-P14) unter Einbeziehung aller Messergebnisse

3.2.6. Taurodesoxycholat (TDC)

Die Konzentrationen von TDC in der Versuchsgruppe lagen innerhalb des statistisch ausgewerteten Zeitraumes stets deutlich unter denen der Kontrollgruppe. So betrug zum Zeitpunkt T1 die Konzentration in der TUDC-Gruppe $3,45 \pm 2,16$ mmol/l, in der NaCl-Gruppe hingegen $9,02 \pm 5,30$ mmol/l. In den folgenden Stunden stieg die TDC-Konzentration in beiden Gruppen zunächst an, fiel ab dem Zeitpunkt T2 in der Kontrollgruppe und T3 in der Versuchsgruppe jedoch wieder ab. Hierbei näherten sich die Konzentrationen in den beiden Gruppen aneinander an.

Der gemessene Konzentrationsunterschied war in der ANOVA annähernd signifikant ($p=0,067$), im t-Test zeigten sich signifikante Konzentrationsunterschiede zu den Zeitpunkten T1 ($p=0,034$) und T2 ($p=0,028$). Im LSD-Test war der Konzentrationsanstieg zwischen T1 und T3 der TUDC-Gruppe signifikant.

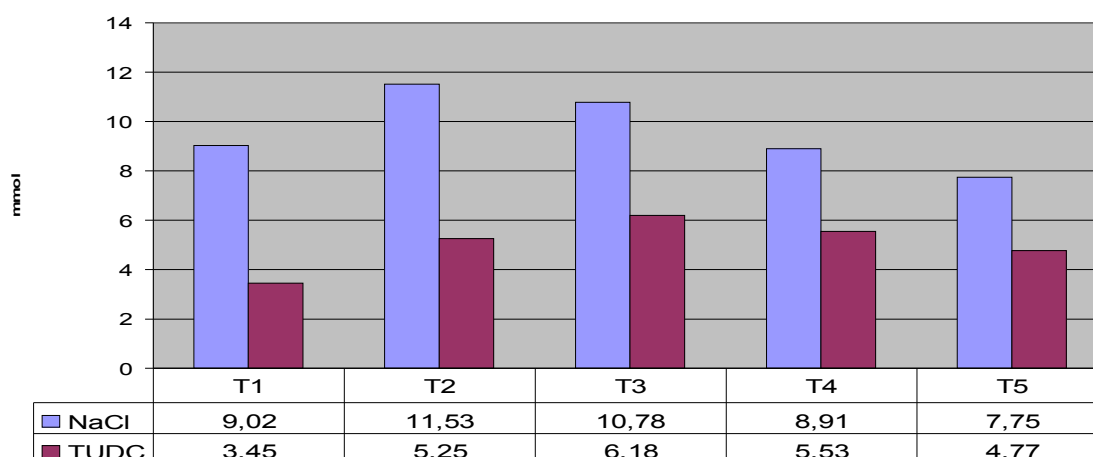


Abb.10: Konzentrationsverlauf TDC (T1-T5) bei den in die Varianzanalyse einbezogenen Tieren ($p=0,067$)

Der Konzentrationsverlauf in den Folgestunden war – bei geringerer Stichprobengröße – uneinheitlich.

In der TUDC-Gruppe sank die Konzentration bis auf $3,45$ mmol/l zum Zeitpunkt T7, stieg in den gemessenen Proben im weiteren Verlauf jedoch wieder an auf $8,50$ mmol/l zum Zeitpunkt T11. An den postoperativen Tagen schwankten die Konzentrationen weiterhin zwischen $3,05$ mmol/l (P5) und $10,37$ mmol/l (P10).

In der NaCl-Gruppe fielen die Werte nach der Operation auf $2,87$ mmol/l (T8) ab, und schwankten an den postoperativen Tagen zwischen $6,38 \pm 2,19$ mmol/l (P1) und $3,60 \pm 3,39$ mmol/l (P3).

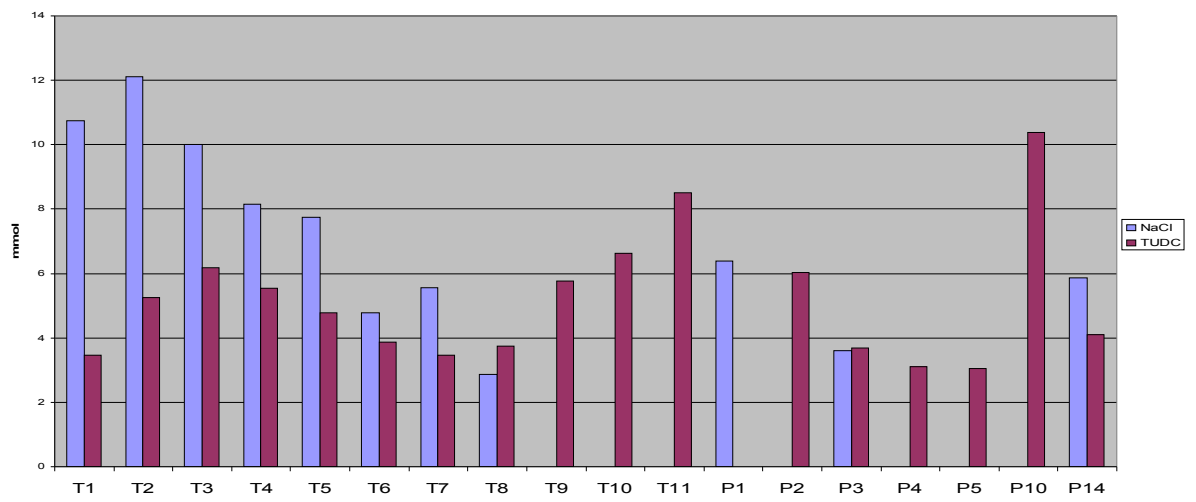


Abb.11: Konzentrationsverlauf TDC (T1-P14) unter Einbeziehung aller Messergebnisse

3.2.7. Glycochenodesoxycholat (GCDC)

Der Konzentrationsverlauf von GCDC sieht innerhalb des Zeitraums T1-T5 bei Versuchs- und Kontrollgruppe ähnlich aus: beide Gruppen zeigen zunächst einen leichten Konzentrationsanstieg zwischen T1 und T2, dann jedoch einen Konzentrationsabfall, der sich ab dem Zeitpunkt T3 verstärkt.

In der Versuchsgruppe fiel die Konzentration von $15,19 \pm 5,18$ mmol/l (T1) auf $10,99 \pm 1,49$ mmol/l (T5) ab, in der Kontrollgruppe von $27,40 \pm 9,52$ mmol/l (T1) auf $19,78 \pm 8,84$ mmol/l (T5).

Die Konzentration lag dabei in der Versuchsgruppe stets sehr signifikant unter der in der Kontrollgruppe ($p=0,006$).

Der t-Test zeigte signifikante Konzentrationsunterschiede zu den Zeitpunkten T1-T4 (T1: $p=0,045$; T2: $p=0,018$; T3: $p=0,006$; T4: $p=0,033$).

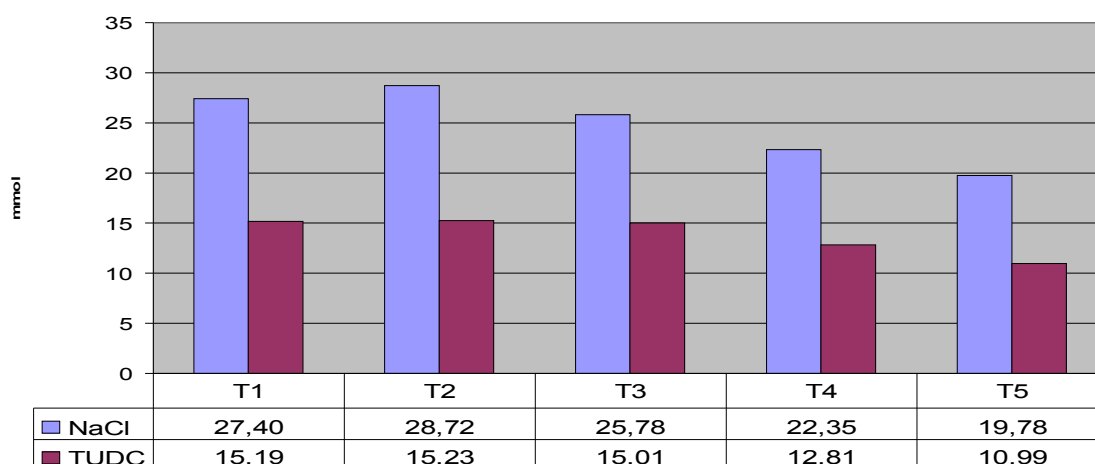


Abb.12: Konzentrationsverlauf GCDC (T1-T5) bei den in die Varianzanalyse einbezogenen Tieren ($p=0,006$)

In den weiteren postoperativen Stunden fielen die GCDC-Konzentrationen bei den Schweinen der Versuchsgruppe zunächst weiter bis auf einen Wert von $8,80 \pm 3,04$ mmol/l ab (T8), stiegen danach jedoch bis zum Zeitpunkt T11 wieder bis auf $16,30$ mmol/l an. An den folgenden postoperativen Tagen schwankten die gemessenen Werte zunächst zwischen $4,40$ mmol/l und $21,06 \pm 11,75$ mmol/l (P2 – P5), und stiegen in der zweiten Woche stark an, bis auf einen Wert von $40,73$ mmol/l (P14).

Bei den Tieren der Kontrollgruppe fielen die Werte bis zum Zeitpunkt T8 ebenfalls weiter ab, blieben (außer zum Zeitpunkt T6, wo die Messwerte beider Gruppen eng beieinander lagen) dabei allerdings stets oberhalb der Konzentrationen in der Versuchsgruppe.

In den zwei folgenden postoperativen Wochen lagen die gemessenen Konzentrationen zunächst leicht über 20mmol/l (P1, P3), und damit weiterhin über den Werten der Versuchsgruppe, zum Zeitpunkt P14 mit 8,22 mmol/l aber deutlich unter den Werten der Versuchsgruppe aus der zweiten Woche.

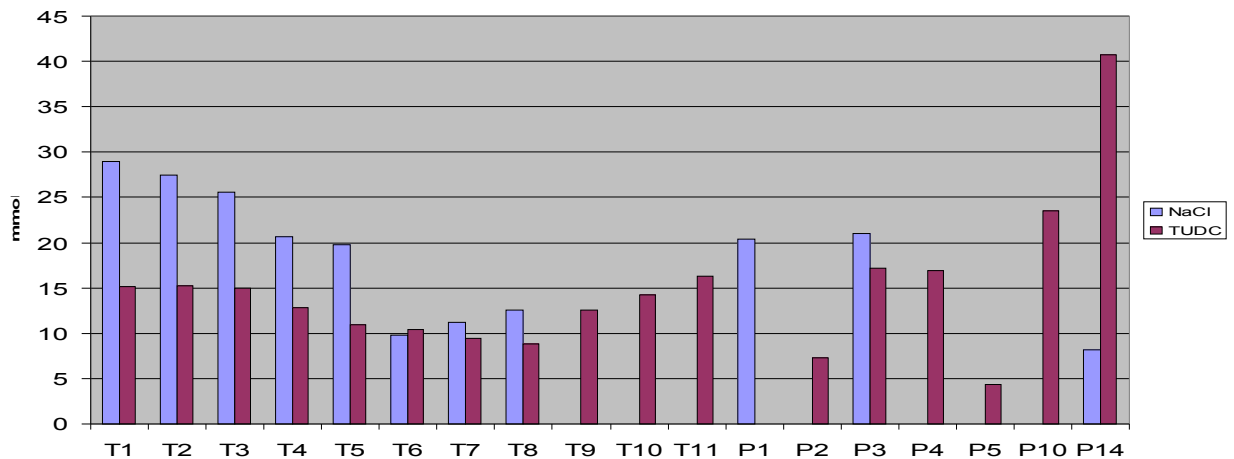


Abb.13: Konzentrationsverlauf GCDC (T1-P14) unter Einbeziehung aller Messergebnisse

3.2.8. Ergebnisübersicht

Die folgende Tabelle stellt die auf den vorangegangenen Seiten ausführlich dargestellten Ergebnisse zur besseren Übersicht nochmals zusammenfassend dar.

Einbezogen wurden nur die zur Varianzanalyse herangezogenen Daten.

Tab.5: Konzentrationsverläufe der untersuchten Gallensäuren in der Übersicht
(in mmol/l)

		T1	T2	T3	T4	T5	p	Kommentar
hydrophile Gallensäuren								
TUDC	NaCl-Gruppe	5,68	4,78	5,38	5,46	5,89	<0,001	signifikant höhere Konzentration
	TUDC-Gruppe	36,69	32,83	28,99	28,67	31,34		
TC	NaCl-Gruppe	13,35	10,93	9,77	9,43	9,87	0,973	kein signifikanter Unterschied
	TUDC-Gruppe	14,35	11,19	9,80	9,35	8,79		
GC	NaCl-Gruppe	25,52	20,61	19,43	18,54	17,34	0,748	kein signifikanter Unterschied
	TUDC-Gruppe	27,28	20,59	17,55	15,51	14,60		
hydrophobe Gallensäuren								
TCDC	NaCl-Gruppe	18,30	18,20	17,18	16,32	16,28	0,017	signifikant niedrigere Konzentration
	TUDC-Gruppe	10,80	11,19	11,67	11,18	10,21		
TDC	NaCl-Gruppe	9,02	11,53	10,78	8,91	7,75	0,067	annähernd signifikant niedrigere Konzentration
	TUDC-Gruppe	3,45	5,25	6,18	5,53	4,77		
GCDC	NaCl-Gruppe	27,40	28,72	25,78	22,35	19,78	0,006	signifikant niedrigere Konzentration
	TUDC-Gruppe	15,19	15,23	15,01	12,81	10,99		

4. Diskussion

Die Lebertransplantation ist ein etabliertes Verfahren zur Behandlung zahlreicher terminaler Lebererkrankungen.

Trotz signifikanter Fortschritte in den vergangenen Jahrzehnten, z.B. in den Bereichen der chirurgischen Technik und der Immunsuppression, kommt es im Rahmen der Lebertransplantation noch immer zu schwerwiegenden frühen Komplikationen, die den postoperativen Verlauf verlängern und bis hin zum Transplantatverlust führen können.

Eine wesentliche Gruppe unter den möglichen Ursachen solcher früher Komplikationen stellen Präservations- und Reperfusionsschäden an den Zellen des Gallentraktes dar, die durch Gallengangsstrikturen zu schwerwiegenden Organschäden führen können.

Sie wurden zunächst als ITBC (ischaemic-type biliary complications) bezeichnet, da ihr Auftreten und Schweregrad offensichtlich abhängig waren von der Ischämiedauer des Transplantats nach Organentnahme. (Sanchez-Urdazpal et al. 1992)

Es hat sich jedoch mittlerweile gezeigt, dass es sich bei diesen Schäden um ein multifaktorielles Geschehen handelt, in dem u.a. der Verlust epithelialer Basalmembranzellen des Gallentraktes durch ATP-Mangel im Rahmen der Organpräservierung, Entzündungsprozesse durch die Einwanderung polymorphkerniger Leukozyten und apoptotische Gewebsschädigung durch die Freisetzung von Cytokinen und freien Sauerstoffradikalen durch Kupffer-Zellen eine Rolle spielen. Zellschäden entstehen nicht nur während der kalten und warmen Ischämiephasen, sondern manifestieren sich oftmals erst nach der Reperfusion des transplantierten Organs. (Kukan, Haddad 2001)

Einen wesentlichen Faktor im multifaktoriellen Entstehen von Präservations- und Reperfusionsschäden des Gallentraktes stellen hydrophobe Gallensäuren dar, v.a. Chenodesoxycholat (CDC) und Desoxycholat (DC) und ihre Konjugate.

Seit längerem ist bekannt, dass diese Säuren Zellmembranenlipide von Leber- und Gallengangszellen lösen, und die Basalmembranen so durchlässiger machen, was zu Zytolyse führen kann (Güldütana et al. 1993). Auch mitochondriale Membranen von Leberzellen werden in gleicher Weise geschädigt, mit der Folge von Zellnekrosen. (Botla et al. 1995)

Darüberhinaus sind weitere zytotoxische Mechanismen hydrophober Gallensäuren bekannt. Sie aktivieren die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen durch Kupffer- Zellen (Sokol et al. 1993), stimulieren die Expression von MHC I Antigenen, mit der Folge von T-Zell vermittelter Zellschädigung (Hillaire et al. 1994) und

induzieren Apoptose durch die Aktivierung von Fas-Apoptose-Rezeptoren (Faubion et al. 1999).

Benedetti et al. konnten 1997 den schädigenden Effekt unkonjugierter hydrophober Gallensäuren an isolierten Gallengangsfragmenten und isolierten perfundierten Rattenlebern nachweisen. Hierbei erwiesen sich epitheliale Gallengangszellen als sehr empfindlich, und zwar weitaus empfindlicher als andere Leberzellen, gegenüber derartiger Schädigung. (Benedetti et al. 1997)

Bereits 1995 hatten Hertl et al. Schweinelebern nach 20 Stunden kalter Präservation untersucht, denen vor der Organentnahme das hydrophobe Gallensalz Taurodesoxycholat (TDC) portal infundiert wurde. Dies führte zu schwersten Schädigungen des Oberflächen- und Drüsenepithels in den untersuchten Lebern. (Hertl et al. 1995)

Im Rahmen der gleichen Studie untersuchten Hertl et al. auch die Auswirkungen von Infusionen der hydrophilen Gallensalze TUDC und Deshydrocholat (DHC). Nach 20 Stunden Präservationszeit kam es hier nur zu geringgradigen Epithelschäden. Darüber hinaus konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass durch eine gleichzeitige Infusion von hydrophoben und hydrophilen Gallensäuren (TDC und TUDC) Schäden am Epithel weitgehend vermieden werden konnten, TUDC also einen protektiven Effekt besitzt. (Hertl et al. 1995)

Der hepatoprotektive Effekt von Ursodesoxycholat (UDC) und seinen Taurin- und Glycinkonjugaten ist im Rahmen der Therapie cholestatischer Lebererkrankungen bekannt und wird dort durch langfristige regelmäßige orale Gaben von UDC erreicht.

Zum einen scheinen UDC und seine Konjugate einen eigenen membranstabilisierenden Effekt zu besitzen. Nach der Hypothese von Güldütuna et al. lagern sie sich in die Zellmembran ein, mit einem apolaren Anteil im Zentrum der Doppelmembran, und einem polaren Anteil nahe ihrer Oberfläche. Hierdurch wird es den hydrophoben Gallensäuren erschwert, sich ihrerseits an die – nun polarere – Oberfläche anzulagern und ihre membrandestabilisierenden Effekte auszuüben. (Güldütana et al. 1993)

Zum anderen hat sich gezeigt, dass die regelmäßige Gabe von UDC zu einer kompetitiven Verdrängung von hydrophoben Gallensäuren aus dem Gallensäurepool führt, wodurch die zelltoxischen Effekte hydrophober Gallensäuren signifikant verringert werden. (Stiehl et al. 1999)

Weitere zytoprotektive und anticholestatische Effekte von UDC und TUDC sind beschrieben, z.B. choleretische Aktivität durch Stimulation einer Calcium-

Proteinkinase-Signalkaskade und Unterdrückung von MHC I und II Antigen-Expression durch Glucocorticoid-Rezeptor-Aktivierung. (Kumar, Tandon 2001)

In einer Reihe von Studien an Ratten- und Schweinelebern konnten Hertl et al. nachweisen, dass die protektiven Eigenschaften hydrophiler Gallensäuren nicht nur im Rahmen der langfristigen Therapie cholestatischer Lebererkrankungen, sondern auch bei der Lebertransplantation eine wichtige Rolle spielen können.

Die Infusion von UDC vor flush-out bei der Organentnahme (Hertl, Engelhard et al. 1997) und zum Zeitpunkt der Reperfusion bei Rattenlebern (Hertl, Clausnitzer et al. 1997) führte zu signifikant niedrigerer Enzymfreisetzung und höheren Gallensäuresekretionsraten als in den Kontrollgruppen.

TUDC-Infusion vor Organentnahme und nach Reperfusion bei der Transplantation von Schweinelebern führte zu signifikant niedrigerer Leberenzymfreisetzung, höherem Gallenfluss, höherer Gallensalzsekretion und elektronenmikroskopisch deutlich besser erhaltener Gallengangsarchitektur. (Hertl, Hertl, Malago et al. 1999; Hertl, Hertl, Kunkel et al. 1999)

Während die Auswirkungen einer perioperativen TUDC-Infusion auf Funktionsparameter und Gewebestruktur im Rahmen dieser Studien eindrucksvoll dargestellt wurden, gibt es in der Literatur bislang keine Veröffentlichungen, in denen die unmittelbaren Auswirkungen der TUDC-Infusion auf die Gallenflüssigkeitszusammensetzung in einem in-vivo-Transplantationsmodell untersucht werden.

Die Fragestellungen dieser Arbeit waren daher:

- 1) Erreicht i.v. infundiertes TUDC in signifikanter Menge durch die Galle den Wirkort, das Gallengangsepithel?
- 2) Wird i.v. infundiertes TUDC, ähnlich wie bei der oralen Verabreichung in der Therapie cholestatischer Lebererkrankungen, zur dominanten Gallensäure in der Zusammensetzung der Gallenflüssigkeit?
- 3) Ändert sich durch die Infusion von TUDC die Konzentration anderer hydrophiler Gallensäuren, die ebenfalls einen protektiven Effekt auf die Zellen besitzen könnten?
- 4) Wird durch die i.v. Infusion der hydrophilen Gallensäure TUDC eine Verdrängung der hydrophoben Gallensäuren bewirkt, d.h. verringert sich die Konzentration hydrophober Gallensäuren in der Gallenflüssigkeit?

Zu 1):

Die durchschnittlich gemessenen Konzentrationen von TUDC in der Gallenflüssigkeit waren in den ersten Stunden nach TUDC-Infusion rund sechsmal höher als die Konzentrationen in der Kontrollgruppe.

Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen, ist doch die Gallensäuresekretion der Hepatozyten ein Vorgang, der direkt abhängt von der Gallensäureaufnahme aus dem Portalvenensystem und anschließendem proteingebundenem Transport im Hepatozyten. (Kumar, Tandon 2001).

Wird nun das venöse Gallensäureangebot an die Hepatozyten durch die Infusion hoher Konzentrationen einer einzelnen Gallensäure verschoben, so überrascht es nicht, dass diese Gallensäure anschließend auch in signifikanter Menge in die Gallenflüssigkeit sekretiert wird.

Neben der intravenösen Infusion hat es in den vergangenen Jahren auch Experimente mit dem Zusatz hydrophiler Gallensäuren zur UW-Spüllösung gegeben. Derartige Studien kamen bislang allerdings zu unterschiedlichen Ergebnissen: Während Falasca et al. im Rahmen von Lebertransplantationen an Menschen signifikant verbesserten Schutz vor Präservations- und Reperfusionsschäden und keine unerwünschten Nebeneffekte durch TUDC-Zusatz feststellten (Falasca et al. 2001), fanden Hertl et al. bei einer ähnlichen Studie an Rattenlebern zwar niedrigere Leberenzymfreisetzung, Gallenfluss und Gallensalzsekretionsrate waren jedoch in der Versuchsgruppe nach 31 Stunden Lagerung reduziert, so dass der UDC-Zusatz in dieser Studie insgesamt nicht von Vorteil gewesen zu sein scheint (Hertl et al. 2001).

Wie im Einleitungsteil dieser Arbeit erwähnt, ist ein wesentliches Problem der Spülung mit UW-Lösung, dass offenbar nur die größeren, distaleren Gallengänge gespült werden, das der Lösung zugesetzte TUDC kleinere Gallengänge jedoch nicht mehr erreicht.

Wie in dieser Studie gezeigt, löst die perioperative intravenöse TUDC-Infusion dieses Problem, da TUDC mit der Gallenflüssigkeit das gesamte Gallengangssystem erreicht.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Konzentrationszunahme von TUDC in der Gallenflüssigkeit schon nach kürzester Zeit, in dieser Studie zum Zeitpunkt T1 (also bereits eine halbe Stunde nach Reperfusion), im vollen Umfang erfolgt ist, die Leber also selbst unter Transplantationsbedingungen ihre in der Einleitung erwähnte äußerst effektive „Pumpfunktion“ für Gallensäuren (Hofman 1988) beibehält.

Zu 2):

Die HPLC, als gewählte Methode dieser Untersuchung, erlaubt Aussagen im Hinblick auf die Konzentration bestimmter untersuchter Gallensäuren. Andere als die in dieser Studie untersuchten Gallensäuren wurden bei der HPLC-Messung nicht erfasst. Es ist daher nicht möglich, exakte Aussagen über den Gesamtanteil von TUDC am Gallensäurenpool zu treffen.

Die vorliegenden Ergebnisse erlauben jedoch Rückschlüsse auf die Veränderungen in der Zusammensetzung des Gallensäurepools.

Demnach war TUDC bei der Versuchsgruppe im ausgewerteten Zeitraum (T1-T5) die am höchsten konzentrierte Gallensäure (um 30mmol/l) in der Gallenflüssigkeit. In der Kontrollgruppe lagen die Konzentrationen dagegen nur um 5mmol/l, also niedriger als bei allen anderen untersuchten Gallensäuren.

Es erscheint jedoch zumindest auf der Basis der hier gezeigten Ergebnisse überzogen, TUDC nach Infusion als **die** dominante Gallensäure zu bezeichnen, da sich auch die Konzentrationen der anderen untersuchten Gallensäuren in gleichen Größenordnungen bewegten (3,45 – 27,28 mmol/l).

Aus der Therapie cholestatischer Lebererkrankungen ist dagegen bekannt, dass regelmäßig oral verabreichtes UDC zur dominanten Gallensäure im Gallensäurepool wird: nach 6 Monaten Behandlung mit 10-12mg/kg pro Tag stellte es 40-50% der vorhandenen Gallensäuren dar. (Bachrach, Hofmann 1982)

Derartige, langfristige Änderungen des Gallensäurepools entstehen jedoch aufgrund kompetitiver Hemmung der ilealen Absorption hydrophober Gallensäuren. (Kumar, Tandon 2001)

UDC wird nach oraler Verabreichung v.a. im Dünndarm, zu einem geringeren Teil auch im Colon, absorbiert, portalvenös zur Leber transportiert, dort nach einer First-Pass-Extraktion von ca. 50% mit Glycin und Taurin konjugiert und über die Gallenflüssigkeit wieder in den Darm zurücktransportiert. UDC-Konjugate werden dann hauptsächlich im distalen Ileum absorbiert, wo sie mit anderen, körpereigenen Gallensäuren um aktiven Transport zur Wiederaufnahme in den enterohepatischen Kreislauf konkurrieren (Paumgartner, Beuers 2002). Nicht absorbierte hydrophobe Gallensäuren werden dann mit den Faeces ausgeschieden und gehen so langsam dem Gallensäurepool verloren.

Im Transplantationsmodell dieser Studie wurde hydrophiles TUDC intravenös, also **nach** dem Stadium der enteralen Absorption, verabreicht. Der Prozess der kompetitiven Absorptionshemmung hydrophober Gallensäuren kam also beim **primären**

Leberdurchlauf nicht zum Tragen. Darüberhinaus wurde TUDC nicht langfristig, sondern nur kurz vor der Organentnahme und dann sechs Stunden nach der Implantation verabreicht.

Dies erklärt, warum zunächst ein deutlicher Anstieg der TUDC-Konzentration – entsprechend dem schnellen Anfluten des i.v. verabreichten TUDC zur Leber – festzustellen war, die Konzentrationen aber schon im Verlauf der nächsten Stunden leicht abfielen, und sich über die nächsten Tage wieder den Ursprungswerten annäherten. Denn je mehr Zeit seit der TUDC-Infusion vergangen war, umso mehr stiegen wieder die Anteile der endogenen hydrophoben Gallensäuren am portalen Gallensäureangebot an (die zwar vorübergehend nur reduziert zur Gallenflüssigkeitsproduktion herangezogen wurden, dem Körper jedoch nach wie vor noch im venösen System zur Verfügung standen), und verdrängten TUDC mehr und mehr aus dem enterohepatischen Kreislauf.

Zu 3):

Um den Effekt der TUDC-Infusion auf andere hydrophile Gallensäuren zu untersuchen, wurden in dieser Studie auch die Konzentrationen von Taurocholat (TC) und Glycocholat (GC) bestimmt, die beide hydrophile Eigenschaften besitzen.

Die Konzentrationen dieser Gallensäuren wichen in Versuchs- und Kontrollgruppe interessanterweise kaum voneinander ab. Ein signifikanter Einfluss von TUDC auf die Konzentrationen der anderen hydrophilen Gallensäuren konnte somit in dieser Untersuchung nicht festgestellt werden.

Vor dem Hintergrund der kompetitiven Verdrängungsprozesse bei Aufnahme von Gallensäuren in den enterohepatischen Kreislauf und beim Transport durch die Leberzellen in die Gallenflüssigkeit überrascht dieses Ergebnis, da zu erwarten wäre, dass diese Prozesse sowohl hydrophobe als auch hydrophile Gallensäuren betreffen, und somit die Infusion einer zusätzlichen Gallensäure in signifikanter Menge zu Konzentrationsverlusten aller anderen Gallensäuren führen müssten.

Einen Erklärungsansatz für die Ergebnisse bieten die hepatozellulären Gallensäure-transportprozesse. Die Aufnahme in den Hepatozyt durch die Basalmembran ist abhängig von einem Natrium-Taurocholat-Cotransporter-Molekül (NTCP) und einem Organischen-Anion-Transportierenden-Polypeptid (OATP) (Hagenbuch, Meier 1994; Kullak-Ublick et al. 1995). Zum anschließenden Transport durch die Zelle werden die Gallensäuren an verschiedene Proteine gebunden und schließlich durch ein ATP-

abhängiges Transportsystem, das sogenannte „sister of p-glycoprotein“ (SPGP) in den Gallen-Canaliculus sekretiert. (Gerloff et al. 1997)

Da der Transport von Gallensäuren durch die Leberzelle von der Verfügbarkeit der erwähnten Transportproteine abhängig ist, kann die Gesamtmenge der transportierten Gallensäuremoleküle nicht unbegrenzt gesteigert werden. Der Transport von in großer Menge zusätzlich angebotenen TUDC muss also einen Verlust bei den Transportraten der anderen Gallensäuren zur Folge haben.

Sollten die Transportprozesse bei entsprechendem portalvenösem Gallensäureangebot hydrophile Gallensäuren bevorzugen, so würden sich die Transportverluste bei hydrophoben Gallensäuren weitaus früher bemerkbar machen, als bei den hydrophilen. Dies würde erklären, warum sich im Rahmen dieser Studie keine signifikanten Konzentrationsänderungen bei den hydrophilen, wohl aber bei den hydrophoben Gallensäuren ergeben haben.

Tatsächlich konnten Gerloff et al. die SPGP-abhängigen Transportraten verschiedener Gallensäuren in canaliculären Rattenleber-Plasmamembranvesikeln bestimmen: die hydrophileren TUDC und TC hatten hierbei höhere Transportraten als das weniger hydrophile GC. Allerdings müssen in diesem Erklärungsmodell noch andere Faktoren eine Rolle spielen, denn auch das hydrophobere TCDC wies in dieser Studie hohe Transportraten auf. (Gerloff et al. 1998)

Im therapeutischen Sinne handelt es sich bei diesem Ergebnis sicher um ein erwünschtes Resultat. Zwar sind UDC und seine Konjugate z.Z. die einzigen hydrophilen Gallensäuren, die zu therapeutischen Zwecken etabliert sind, und sie sind somit auch die am besten erforschten. (Kumar, Tandon 2001)

Aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften kann jedoch davon ausgegangen werden, dass auch die anderen hydrophilen Gallensalze weniger gewebstoxisch sind als hydrophobe Gallensäuren, dass sie vielleicht sogar protektive Eigenschaften haben. So konnten Benedetti et al. in ihrer oben erwähnten Studie zwar starke Gewebsschäden durch unkonjugierte hydrophobe Gallensäuren, nicht jedoch durch hydrophile Gallensäuren feststellen. (Benedetti et al. 1997)

Zu 4):

Eine der wesentlichsten Fragen, die mit dieser Studie untersucht wurde ist, ob es durch die Infusion von TUDC zu signifikanten Änderungen in der Konzentration hydrophober Gallensäuren gekommen ist.

Wie bereits weiter oben diskutiert, hatte sich der Gallensäurepool durch die perioperativen Infusionen nicht genügend verändert, um TUDC zur dominanten Gallensäure zu machen. Darüber hinaus hatten sich die Konzentrationen der hydrophilen Gallensäuren nicht signifikant geändert.

Demgegenüber zeigten sich bei allen drei hydrophoben Gallensäuren (Taurochenodesoxycholat (TCDC), Taurodesoxycholat (TDC) und Glycochenodesoxycholat (GCDC)) deutliche Unterschiede zwischen ihren Konzentrationen in den beiden Gruppen.

So waren im ausgewerteten Zeitraum die Konzentration von TCDC und GCDC in der Versuchsgruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe, z.T. waren die gemessenen Konzentrationen in der Versuchsgruppe nur rund halb so groß wie in der Kontrollgruppe.

Auch die Konzentration von TDC war in der Versuchsgruppe in den ersten fünf Stunden deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe, in der statistischen Analyse waren diese Konzentrationsunterschiede mit $p=0,067$ jedoch knapp jenseits der angenommenen Signifikanzschwelle. Zu den Einzelzeitpunkten T1 und T2 waren die gemessenen Konzentrationsunterschiede jedoch auch hier – im post-test - statistisch signifikant.

Hydrophile- und hydrophobe Gallensäuren konkurrieren im enterohepatischen Kreislauf sowohl um die Absorption im Darm als auch um die Aufnahme in den und Transport durch den Hepatozyten.

Wie bereits weiter oben dargelegt, wird durch die perioperative intravenöse Gabe von TUDC keine langfristige Veränderung des Gallensäurepools erreicht, und die ileale Absorption kommt erst im weiteren Verlauf zum Tragen. Die gemessenen, z.T. signifikanten Konzentrationsunterschiede müssen also bei der Gallensäureproduktion im Hepatozyten entstanden sein.

Die beiden hierfür infrage kommenden Ursachen sind – wie in den vorangegangenen Abschnitten besprochen - einerseits das plötzliche große Angebot an TUDC bei begrenzter Transportkapazität der Leberzellen sowie andererseits eine wahrscheinliche Bevorzugung der hydrophilen Gallensäuren beim Transport durch die Leberzellen.

Eine genauere Betrachtung der Ergebnisse bei den hydrophoben Gallensäuren zeigt relative große Konzentrationsunterschiede zwischen den Gruppen zu den frühen Messzeitpunkten, aber schon nach wenigen Stunden nähern sich die gemessenen Werte in beiden Gruppen wieder an.

Dies wäre tatsächlich in Übereinstimmung mit den vermuteten Wirkmechanismen, denn nach dem initialen Überangebot durch anflutendes TUDC normalisiert sich schon nach kurzer Zeit das Gallensäureangebot an die Leber, da mit jedem Umlauf des enterohepatischen Kreislaufs TUDC im Darm verloren geht, und körpereigene hydrophobe Gallensäuren durch Rückresorption wieder vermehrt dem Gallensäurepool zur Verfügung stehen.

Die Effekte von TUDC zum Schutz von Leber- und Gallengewebe sind in Studien v.a. von Hertl et al. überzeugend in vitro und an Transplantationsmodellen in vivo dargestellt worden. Darüber hinaus sind die zytotoxischen Auswirkungen hydrophober Gallensäuren und die therapeutischen Effekte von UDC, v.a. in cholestatischen Lebererkrankungen, seit längerer Zeit Gegenstand intensiver Forschung.

Die hier vorliegende Studie hat nun erstmals untersucht, welche Unterschiede in der Zusammensetzung von Gallenflüssigkeit auftreten, wenn TUDC im Rahmen einer Lebertransplantation perioperativ infundiert wird.

Zum einen kommt es zu einem signifikanten Anstieg von TUDC in der Gallenflüssigkeit, wodurch die TUDC-eigenen gallengangsprotektiven Effekte intensiviert werden.

Zum anderen wird die Konzentration hydrophober Gallensäuren z.T. signifikant gesenkt, was Epithelschäden durch diese Säuren reduziert.

Die bekannten protektiven Effekte einer TUDC-Infusion können mithilfe dieser Ergebnisse besser erklärt, ihr Zustandekommen besser verstanden werden.

Die hepatozellulären Gallensäuretransportmechanismen, die zu diesen Ergebnissen geführt haben, sind bislang nur teilweise bekannt und sollten weiter erforscht werden.

Es gibt derzeit eine Vielzahl von Ansätzen zur Reduktion von Präservations- und Reperfusionsschäden im Rahmen von Lebertransplantationen. Sie lassen sich aus einer praktischen Perspektive unterteilen in chirurgische, pharmakologische und gentherapeutische Strategien. (Selzner et al. 2003)

Die zwei wesentlichsten, und bereits genutzten, chirurgischen Techniken sind die ischämische Präkonditionierung (Clavien et al. 2000) und das Unterbrechen langer ischämischer Zeiträume durch wiederholte kurze Reperusionsintervalle („intermittend clamping“) (Belghiti et al. 1999).

Gentechnische Ansätze zielen v.a. auf die Unterdrückung apoptotischer Vorgänge im Leber- und Gallengangsgewebe, durch die Entfernung von Apoptose-Rezeptoren von der Zelloberfläche oder durch Veränderung der Stress-Response-Kaskade, z.B. mit einer reduzierten Freisetzung von Sauerstoff-Radikalen. Erfolge in diesem Bereich werden jedoch u.a. von der meist nur kurzen Zeit erschwert, die für eine Transplantation zur Verfügung steht, und die längerfristige „Umprogrammierungen“ des Zellgenoms, erweitert ggf. um die Zeit bis zur Expression bestimmter Merkmale, kaum zulässt. (Selzner et al. 2003)

Auf pharmakologischer Ebene wird mit zahlreichen Substanzen experimentiert, die zumeist entweder zytotoxische Vorgänge blockieren sollen, oder die durch eine geringgradige Reizung zelluläre Verteidigungsmechanismen gegen die bevorstehenden Präservations- und Reperfusionsschäden induzieren sollen. Bislang scheint es in diesen Bereichen keine Substanzen zu geben, die routinemässig klinisch eingesetzt werden könnten. (Selzner et al. 2003)

Die perioperative TUDC-Infusion ist unter den pharmakologischen Strategien zur Reduzierung von Präservations- und Reperfusionsschäden im Rahmen von Lebertransplantationen ein sehr vielversprechender Ansatz.

Gegenstand zukünftiger Forschung sollte nun u.a. sein, ob und wie sich die experimentellen Erfolge zur Reduktion von Komplikationsraten klinisch einsetzen lassen.

5. Zusammenfassung

Postoperative Komplikationen im Bereich der Gallenwege sind trotz fortschrittlicher Operationstechniken ein großes Problem bei Lebertransplantationen.

Eine wesentliche Ursache scheinen hydrophobe Gallensäuren zu sein, die bei der Organentnahme in den Gallengängen verbleiben, und sich vermutlich membranschädigend auf die Zellen des Gallengangsgewebes auswirken. Demgegenüber besitzen hydrophile Gallensäuren gewebsschützende Eigenschaften.

Frühere Studien haben gezeigt, dass die perioperative Infusion der hydrophilen Gallensäure Tauroursodesoxycholat (TUDC) Leberparameter und das histologische Erscheinungsbild der Gallengänge positiv beeinflusst. Hierfür werden eigene membranstabilisierende Eigenschaften von TUDC sowie eine Verdrängung hydrophober Gallensäuren aus der Gallenflüssigkeit postuliert.

Bislang war nicht bekannt, wie sich die Zusammensetzung von Gallenflüssigkeit nach perioperativer TUDC-Infusion bei Lebertransplantationen verändert. Dies würde Rückschlüsse auf die Wirkweise von TUDC zulassen, und bei der Entwicklung von Therapieoptionen zur Verhinderung von Gallengangskomplikationen helfen.

Zur Untersuchung der postoperativen Konzentrationen von drei hydrophilen und drei hydrophoben Gallensäuren in der Gallenflüssigkeit wurden die Lebern von 12 Landschweinen transplantiert. Vor der Explantation und nach der Reperfusion wurde den Tieren der Versuchsgruppe (n=6) TUDC i.v. infundiert, die Tiere der Kontrollgruppe (n=6) erhielten zeitlich entsprechende isotonische Natriumchloridlösungs-Infusionen.

Die postoperative Konzentration von TUDC war in den Proben der Versuchsgruppe signifikant höher, während sich keine signifikanten Unterschiede bei den Konzentrationen der zwei anderen untersuchten hydrophilen Gallensäuren zeigten. Demgegenüber hatten die untersuchten hydrophoben Gallensäuren in der Versuchsgruppe deutlich, bei zwei Gallensäuren signifikant, niedrigere Konzentrationen.

Die Ergebnisse zeigen sowohl eine Verschiebung der Zusammensetzung der Gallenflüssigkeit weg von den hydrophoben Gallensäuren, als auch eine erhöhte Konzentration von TUDC in der Gallenflüssigkeit, was den membranstabilisierenden Effekt von TUDC unterstützen würde.

Dieses Wissen kann in der zukünftigen Entwicklung von Verfahren zur Verringerung von Gallengangsschäden nach Lebertransplantation hilfreich sein. Bis zu einer klinischen Anwendung besteht weiterer Forschungsbedarf.

6. Literaturverzeichnis

Angelico, M., Tisone, G., Baiocchi, L., Palmieri, G., Pisani, F., Negrini, S., Anselmo, A., Vennarecci, G., Casciani, CU. (1999):
One-year pilot study on tauroursodeoxycholic acid as an adjuvant treatment after liver transplantation.

Ital J Gastroenterol Hepatol 31, 462-468.

Armstrong, MJ., Carey, MC. (1982):

The hydrophobic-hydrophilic balance of bile salts. Inverse correlation between reverse-phase high performance liquid chromatographic mobilities and micellar cholesterol-solubilizing capacities.

J Lipid Res 23, 70-80.

Bachrach, WH., Hofmann, AF. (1982):

Ursodeoxycholic acid in the treatment of cholesterol cholelithiasis (Part I).

Dig Dis Sci 27: 737-761

Belghiti, J., Noun, R., Malafosse, R., Jagot, P., Sauvanet, A., Pierangeli, F., Marty, J., Farges, O. (1999):

Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study.

Ann Surg 229: 369-375

Benedetti, A., Alvaro, D., Bassotti, C., Gigliozi, A., Ferretti, G., La Rosa, T., Di Sario, A., Baiocchi, L., Jezequel, AM. (1997):

Cytotoxicity of Bile Salts Against Biliary Epithelium: A Study in Isolated Bile Ductule Fragments and Isolated Perfused Rat Liver.

Hepatology 26, 9-21.

Benichou, J., Halgrimson, CG., Weil, R., et al. (1977):

Canine and human liver preservation for 6-18 hours by cold infusion.

Transplantation 24, 407-411.

Botla, R., Spivey, JR., Aguilar, H., Bronk, SF., Gores, GJ. (1995):

Ursodeoxycholat (UDCA) inhibits the mitochondrial membrane transition induced by chenodeoxycholate: A mechanism of UDCA protection.

J Pharmacol Exp Ther 272: 930-938

Calne, RY., Pegg, DE., Pryse-Davis, J., Leigh-Brown, F. (1963) :

An experimental study relating to kidney transplantation from cadavers.

Br.Med.J. 2:651-654.

Cannon, JA. (1956):

Brief report.

Transplant Bull 3, 7.

Clavien, PA., Yadav, S., Sindram, D., Bentley, RC. (2000):

Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans.

Ann Surg 232: 155-162

Falasca, L., Tisone, G., Palmieri, G., Anselmo, A., Di Paolo, D., Baiocchi, L., Torri, E., Orlando, G., Gasciani, CU., Angelico, M. (2001):
Protective role of tauroursodeoxycholate during harvesting and cold storage of human liver: a pilot study in transplant recipients.
Transplantation 71, 1268-1276.

Faubion, WA., Guicciardi, ME., Miyoshi, H., Bronk, SF., Roberts, PJ., Svingen, PA., Kaufmann, SH., Gores, GJ. (1999):
Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas.
J Clin Invest 103: 137-145

Friman, S., Svanvik J. (1994):
A possible role of ursodeoxycholate acid in liver transplantation.
Scand J Gastroenterol Suppl 204, 62-64.

Fuller, BJ (1991): The effects of cooling on mammalian cells.
In: Fuller, BJ., Grout, BW. (Eds.): *Clinical Application of Cryobiology*. 1st Ed.; S.1-22. Boca Raton: CRC Press.

Galle, PR., Theilmann, L., Raedsch, R., Otto, G., Stiehl, A. (1990):
Ursodeoxycholate Reduces Hepatotoxicity of Bile Salts in Primary Human Hepatocytes.
Hepatology 12, 486-491.

Gerloff, T., Stieger, B., Hagenbuch, B., Landmann, L., Meier, PJ. (1997):
The sister P-glycoprotein of rat liver mediates ATP-dependant taurocholate (TCA) transport.
Hepatology 26: A358 (Abstract)

Gerloff, T., Stieger, B., Hagenbuch, B., Madon, J., Landmann, L., Roth, J., Hofmann, AF., Meier, PJ. (1998):
The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver.
J Biol Chem 273: 10046-10050

Greif, F., Bronsther, OL., Van Thiel, DH. et al (1994):
The incidence, timing, and management of biliary tract complications after orthotopic liver transplantation.
Ann Surg 219: 40-45.

Güldütuna, S., Zimmer, G., Imhof, M., Bhatti, S., You, T., Leuschner, U. (1993):
Molecular Aspects of Membrane Stabilization by Ursodeoxycholate.
Gastroenterology 104, 1736-1744.

Hagenbuch, B., Meier, PJ. (1994):
Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺ / bile acid cotransporter.
J Clin Invest 93: 1326-1331

- Hamilton, JG., Comai, K. (1988):
 Separation of neutral lipid, free fatty acid and phospholipid classes by normal phase HPLC.
Lipids 23, 1150-1153.
- Heathcote, EJ., Cauch-Dudek, K., Walker, V., Bailey, RJ., Blendis, LM., Ghent, CN., Michieletti, P., Minuk, GY., Pappas, SC., Scully, LJ., Steinbrecher, UP., Sutherland, LR., Williams, CN., Witt-Sullivan, H., Worobetz, LJ., Milner, RA., Wanless IR. (1994):
 The Canadian Multicenter Double-blind Randomized Controlled Trial of Ursodeoxycholic Acid in Primary Biliary Cirrhosis.
Hepatology 19, 1149-1156.
- Hertl, M. (1999):
 Konservierungs- und Reperfusionsschädigung der Leber – Strategien zur Verbesserung der Organqualität im Rahmen der Transplantation.
 Habil., Essen; s.bes.S.16.
- Hertl, M., Clausnitzer, N., Hertl, MC., Broelsch, CE. (2001):
 Effect of ursodeoxycholate in University of Wisconsin solution on long term preservation of rat livers.
Eur J Surg 167: 438-442
- Hertl, M., Clausnitzer, N., Rogiers, X., Jung, R., Broelsch, CE. (1997):
 Infusion of hydrophilic Bile Salts Protects the Liver from Reperfusion Injury in the Rat.
Transplantation Proceedings 29, 386-387.
- Hertl, M., Engelhard, O., Vollmers, B., Rogiers, X., Jung, R., Broelsch, CE. (1997):
 Donor Pretreatment with Hydrophilic Bile Salts Protects the Liver From Preservation and Reperfusion Injury in the Rat.
Transplantation Proceedings 29, 388-389.
- Hertl, M., Harvey, PRC., Swanson, P., Howard, TK., Shenoy, S., West, DD., Howard, TK., Shenoy, S., Strasberg, SM. (1995):
 Evidence of Preservation Injury to Bile Ducts by Bile Salts in the Pig and its Prevention by Infusions of Hydrophilic Bile Salts.
Hepatology 21, 1130-1137.
- Hertl, M., Hertl, MC., Kluth, D., Broelsch, CE. (2000):
 Hydrophilic Bile Salts Protect Bile Duct Epithelium During Cold Preservation: A Scanning Electron Microscopy Study.
Liver Transplantation 6, 207-212.
- Hertl, M., Hertl, MC., Kunkel, P., Schilling, S., Prevot, B., Kluth, D., Malago, M., Broelsch, CE. (1999):
 Tauroursodeoxycholate ameliorates reperfusion injury after pig liver transplantation.
Transpl Int 12, 454-462.
- Hertl, M., Hertl, MC., Malago, M., Broelsch, CE. (1999):
 In vivo protection of the pig liver against ischemia / reperfusion injury by tauroursodeoxycholate.
Langenbecks Arch Surg 384: 461-466.

- Heuman, DM. (1993):
Hepatoprotective Properties of Ursodeoxycholic Acid.
Gastroenterology 104, 1865-1870.
- Heuman, DM., Pandak WM., Hylemon, PB., Vlahcevic, ZR. (1991):
Conjugates of Ursodeoxycholate Protect Against Cytotoxicity of More Hydrophobic Bile Salts: *In Vitro* Studies in Rat Hepatocytes and Human Erythrocytes.
Hepatology 14, 920-926.
- Hillaire, S., Boucher, E., Calmus, Y., Gane P., Ballet, F., Franco, D., Moukthar, M., Poupon, R. (1994) :
Effects of bile acids and cholestasis on major histocompatibility complex class I in human and rat hepatocytes.
Gastroenterology 107: 781-788
- Hofmann, AF (1976):
Advanc.intern.Med.21, 501.
- Hofmann, AF. (1988): Bile Acids.
In: Arias, IM., Jakoby, WB., Popper, H., Schachter, D., Shafritz, DA. (Eds.): The Liver: Biology and Pathobiology, 2nd Edition; S.553-572. New York: Raven Press.
- Ishigama, F., Naka, S., Takeshita, K., Kurumi, Y., Hanasawa, K., Tani, T. (2001):
Bile salt tauroursodeoxycholic acid modulation of Bax translocation to mitochondria protects the liver from warm ischemia-reperfusion injury in the rat.
Transplantation 72, 1803-1807.
- Keeffe, EB. (2001):
Liver transplantation: current status and novel approaches to liver replacement.
Gastroenterology 120, 749-762.
- Knoop, M., Schnoy, N., Keck, H., Neuhaus, P. (1992):
Morphological Changes of Human Common Bile Ducts after Extended Cold Preservation.
Transplantation 56, 735-736.
- Kukan, M., Haddad, PS. (2001):
Role of Hepatocytes and Bile Duct Cells in Preservation-Reperfusion Injury of Liver Grafts.
Liver Transplantation 7, 381-400.
- Kullak-Ublick, GA., Hagenbuch, B., Stieger, B., Schteingart, CD., Hofmann, AF., Wolkoff, AW., Meier, PJ. (1995):
Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver.
Gastroenterology 109: 1274-1282
- Kumar, D., Tandon, RK. (2001):
Use of ursodeoxycholic acid in liver diseases.
J Gastroenterol Hepatol 16: 3-14

- Kurokawa, T., Takagi, H. (1999):
Mechanism and Prevention of Ischaemia-Reperfusion Injury.
Transplantation Proceedings 31, 1775-1776.
- Lee, BL., New, AL., Ong, CN. (1997):
Comparative analysis of conjugated bile acids in human serum using high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis.
J Chromatogr B 704, 35-42.
- Lemasters, JL., Bunzendahl, H., Thurman, RG. (2001): Preservation of the Liver.
In: Maddrey, WC., Schiff, ER., Sorrell, MF. (Eds.): Transplantation of the Liver; S.251-273. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkin.
- Lentner, C. (Red.) (1977)
Wissenschaftliche Tabellen Geigy, Teilband Körperflüssigkeiten; 8.Auflage.
Basel: CIBA-GEIGY Ltd, s.bes. S.136-143.
- Leuschner, U., Leuschner, M., Sieratzki, J., Kurtz, W., Hubner, K.. (1985):
Gallstone dissolution with ursodeoxycholic acid in patients with chronic active hepatitis and two years follow-up.
Dig Dis Sci 30, 642-649.
- Marchioro, TL., Axtell, HK., LaVia, MF., et al (1964):
The role of adrenocortical steroids in reversing established homograft rejection.
Surgery 55, 412-417.
- Margreiter R. (1998):
Indikationen und Ergebnisse der Lebertransplantation.
Ther.Umsch. 55, 134-138.
- Mazariegos GV., Molmenti EP., Kramer, DJ. (1999):
Early complications after orthotopic liver transplantation.
Surg Clin North Am 79, 109-129.
- Moore, FD., Smith LL., Burnap TK., et al (1959):
One stage homotransplantation of the liver following total hepatectomy in dogs.
Transplantation 6, 103.
- Morrissey, M., Rustand, L. (1996): Financial Considerations in Liver Transplantation.
In: Busuttil, RW., Klintmalm, GB. (Eds.): Transplantation of the Liver. S.861-868.
Philadelphia, London, Toronto (usw.): W.B.Saunders.
- Nakayama, F. (1988):
Quantitative microanalysis of bile acids in biological samples. Collaborative study.
J Chromatogr 452, 399-408.
- Paumgartner, G., Beuers, U. (2002):
Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited.
Hepatology 36: 525-531

Rockey, DC. (2001): Selection of Patients and Timing of Liver Transplantation.
In: Killenberg, PG., Clavien, PA. (Eds.): Medical Care of the Liver Transplant Patient. S.3-22. Malden, Winnipeg, Carlton (usw.): Blackwell Science.

Roda, A., Piazza, F., Baraldini, M. (1998):
Seperation techniques for bile salt analysis.
J Chromatogr B, 717, 263-278.

Rodrigues, CM., Kren, BT., Steer, CJ., Setchell, KD. (1995):
Tauroursodeoxycholate increases rat liver ursodeoxycholate levels and limits lithocholate formation better than ursodeoxycholate.
Gastroenterology 109, 564-572.

Sanchez-Urdazpal, L., Gores, GJ., Ward, EM., Maus, TP., Buckel, EG., Steers, JL., Wiesner, RH., Krom, RAF. (1993):
Diagnostic Features and Clinical Outcome of Ischaemic-type Biliary Complications After Liver Transplantation.
Hepatology 17, 605-609.

Sanchez-Urdazpal, L., Gores, GJ., Ward, EM., Maus, TP., Wahlstrom, HE., Moore, SB., Wiesner, RH., Krom, RAF. (1992):
Ischaemic-type Biliary Complications after Orthotopic Liver Transplantation.
Hepatology 16, 49-53.

Scalia, S. (1995):
Bile acid seperation.
J Chromatogr B, 671, 299-317.

Schaffner, F. (1992): An overview of transplantation of the liver.
In: Fabry, TL., Klion, FM. (Eds.): Guide to Liver Transplantation. S.1-12. New York, Tokyo: Igaku-Shoin.

Selzner, N., Rudiger, H., Graf, R., Clavien, PA. (2003):
Protective strategies against ischemic injury of the liver.
Gastroenterology 125: 917-936

Serracino-Inglott, F., Habib, NA., Mathie RT. (2001):
Hepatic ischemia-reperfusion injury.
Am J Surg 181, 160-166.

Shaked, A., Drazan, KE. (1996): Gene Therapy in Transplantation.
In: Busuttil, RW., Klintmalm, GB. (Eds.): Transplantation of the Liver. S.789-795. Philadelphia, London, Toronto (usw.): W.B.Saunders.

Soderdahl, G., Nowak, G., Duraj, F., Wang, FH., Einarsson, C., Ericzon, BG. (1998):
Ursodeoxycholic acid increased bile flow and effects bile composition in the early postoperative phase following liver transplantation.
Transpl Int 11 Suppl1, 231-238.

Sokol, RJ., Deveraux, M., Khandwala, R., O'Brien, K. (1993):
Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes.
Hepatology 17: 869-881

Southard, JH., Belzer, FO. (1996): Principles of Organ Preservation.
In: Busuttil, RW., Klintmalm, GB. (Eds.): Transplantation of the Liver. S.379-385.
Philadelphia, London, Toronto (usw.): W.B.Saunders.

Starzl, TE. (1996): History of Liver and Other Splanchnic Organ Transplantation.
In: Busuttil, RW., Klintmalm, GB. (Eds.): Transplantation of the Liver. S.3-22.
Philadelphia, London, Toronto (usw.): W.B.Saunders.

Starzl, TE., Demetris, AJ. (1990): Liver Transplantation.
Chicago, London, Boca Raton (usw.): Year Book Medical Publishers; s.bes.S.3f.

Starzl, TE., Kaupp, HA., Brock, DR., et al (1960):
Reconstructive problems in canine liver homotransplantation with special reference to the postoperative role of hepatic venous flow.
Surg Gynec Obstet 111, 733-743.

Starzl TE., Klintmalm, GB., Porter KA., Iwatsuki, S., Schroter, GP. (1981):
Liver transplantation with use of cyclosporin A and prednisone.
New Engl J Med 305, 266-269.

Stiehl, A., Benz, C., Sauer, P. (1999):
Mechanism of hepatoprotective action of bile salts in liver disease.
Gastroenterol Clin N Am 28: 195-209

Tan, CK. (2000):
Liver transplantation: late complications.
Transplant Proc 32: 1517-1518.

Welch, CS. (1955):
A note on transplantation of the whole liver in dogs.
Transplant Bull 2, 54-55.

7. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome (HIV-Erkrankung)
ALT	Alaninaminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome (akutes Lungenversagen)
ATP	Adenosin-Triphosphat
CA	Kalifornien (als Adress-Bestandteil)
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalie-Virus
DHC	Dehydrocholat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
Fr	French (Katheter-Größenmaß)
GC	Gaschromatographie
GC	Glycocholat
GCDC	Glycochenodesoxycholat
GDC	Glycodesoxycholat
GLC	Glycolithocholat

HAS	Arteria hepatica Stenose
HAT	Arteria hepatica Thrombose
HBV	Hepatitis B-Virus
HC	Hyocholat
HDC	Hyodesoxychololat
HIV	Human Immunodeficiency Virus (humanes Immunschwächevirus)
HPLC	High-performance Liquid Chromatography (Hochleistungs-Flüssigchromatographie)
iE	internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
inf.	inferior
ITBC	Ischaemic-type biliary complications
i.v.	intravenous
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
min	Minuten
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MO	Missouri (als Adress-Bestandteil)
NaCl	Natriumchlorid
NIH	National Institutes of Health (Agentur des Gesundheitsministeriums der Vereinigten Staaten)
nm	Nanometer

ODS	Octadecylsilane (HPLC-Säulenmaterial)
PBC	Primär-biliäre Zirrhose
PDS	Polydioxan
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration („potentia hydrogenii“)
pKa	negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtskonstanten Ka einer chemischen Reaktion
p.o.	per os
PSC	Primär Sklerosierende Cholangitis
PTLD	Post-transplant lymphoproliferative disease
sup.	superior
Tab.	Tabelle
TC	Taurocholat
TCDC	Taurochenodesoxycholat
TDC	Taurodesoxycholat
TLC	Taurolithocholat
TUDC	Tauroursodesoxycholat
UDC	Ursodesoxycholat
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UW	University of Wisconsin
V.	Vena
Vv.	Venae

ZNS	Zentrales Nervensystem
ZVK	Zentraler Venenkatheter
γ GT	Gammaglutamyltransferase
μ g	Mikrogramm
μ m	Mikrometer
μ mol	Mikromol
$^{\circ}$ C	Grad Celsius

8.Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. Martin Hertl danke ich sehr herzlich für die umfassende und geduldige Betreuung dieser Arbeit. Seine über Jahre in aufwendigen Studien gewonnenen Kenntnisse über den Einsatz von TUDC bei Lebertransplantationen lagen dem Thema dieser Arbeit zugrunde. Ohne seinen großartigen Einsatz wäre die Probengewinnung im Rahmen der Tierexperimente nicht denkbar gewesen. Ich danke ihm ebenfalls für die Heranführung an die komplexe Labortechnik und die stete weitere Beratung bei der Fertigstellung dieser Arbeit, auf die ich mich trotz z.T. großer räumlicher Distanz jederzeit verlassen konnte.

Meinem Vater Dr. Dieter Lutz danke ich sehr für seinen Rat in zahlreichen Fragen des wissenschaftlichen Arbeitens und v.a. für seine große Hilfe bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit.

Allen Mitgliedern des experimentell-chirurgischen Teams, insbesondere Frau Dr. Catherine Hertl, danke ich sehr für ihren engagierten Einsatz.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Christoph E. Broelsch danke ich sehr für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit in seiner Klinik.

9. Lebenslauf

Name	Jan Markus Lutz
Persönliche Daten geboren	am 10.Mai 1973 in Hamburg
Wohnort	Manchester, England
Vater	Dr. Dieter Lutz, Psychologe
Mutter	Dr. Luise Lutz, Sprachtherapeutin
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Schule 1979 – 1983	Gundschule Gorch-Fock-Schule, Hamburg und Heinrich-Rantzau-Schule, Bad Segeberg
1983 – 1993	Gymnasium Bondenwald, Hamburg
Jan. 1990 – Dez. 1990	Austauschschüler Mt.Maunganui College, Tauranga, Neuseeland
Juli 1993	Abitur
Zivildienst Sept.1993 - Nov.1994	Rettungsdienst und Krankenförderung Johanniter-Unfall-Hilfe, Hamburg
Studium April 1995 – April 2002	Medizinstudium Universität Hamburg
April 2002	Ärztliche Prüfung
Februar 2004	Approbation als Arzt

Berufliche Tätigkeit

Arzt im Praktikum (Pre-Registration House Officer)

August 2002 – Februar 2003

Innere Medizin

Wythenshawe Hospital

Manchester, England

Februar 2003 – Februar 2004

Innere Medizin und Allgemeinchirurgie

Norfolk & Norwich University Hospital

Norwich, England

Assistenzarzt (Senior House Officer)

Februar 2004 – August 2004

Notfallmedizin (Accident & Emergency)

St.James's University Hospital

Leeds, England

Seit August 2004

Anästhesie und Intensivmedizin

The Royal Oldham Hospital

Oldham, Greater Manchester, England